



# **Envelhecimento de Sumos e Refrigerantes. Efeito da embalagem no perfil aromático e teor de ácido ascórbico**

**Filipa Norton de Matos Manzoni de Sequeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar - Qualidade e Segurança Alimentar**

Orientador: Professora Doutora Margarida Moldão Martins

Co-orientador: Professora Doutora Maria do Rosário Bronze

## **Júri:**

Presidente: - Doutor Bernardo Manuel Teles de Sousa Pacheco de Carvalho,  
Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de  
Lisboa

Vogais: - Doutor Luís Filipe Vilas Boas, Professor Associado do Instituto Superior  
Técnico da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Maria do Rosário Beja Figueiredo Gonzaga Bronze, Professora  
Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;

- Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto  
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2009

---

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Professora Doutora Margarida Moldão Martins pelo seu apoio incansável ao longo do meu trabalho, pelos ensinamentos no tratamento estatístico dos dados apresentados e acima de tudo pela sua ajuda, amizade e carinho demonstrados durante todo o curso.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Maria Rosário Bronze pelo apoio incondicional e dedicação ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor Luís Filipe Vilas Boas pela disponibilidade, pelas pesquisas bibliográficas, pela sua paciência e ajuda na parte laboratorial deste trabalho.

À Doutora Carmen Pinheiro pelo tratamento das amostras no envelhecimento dos sumos, pelos conhecimentos e sabedoria transmitidos durante a visita guiada na empresa Compal+Sumol e ao longo de todo o meu trabalho.

À empresa Compal+Sumol pelo financiamento do trabalho realizado no IBET.

À Engenheira Elsa Carvalho da Compal+Sumol pela oportunidade que me foi concedida na realização deste trabalho.

Agradeço ainda a todos os colegas do IBET pela ajuda e simpatia com que me receberam.

À minha família, e amigos, que sempre me deram força e encorajamento ao longo destes meses.

Um agradecimento especial ao João, que esteve sempre presente quando eu precisei e pela paciência que demonstrou.

---

## Resumo

Neste trabalho procedeu-se à análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS) e determinação do teor de ácido ascórbico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em sumos e refrigerantes em diferentes embalagens (PET e Tetrapak), sujeitos a diferentes tempos e temperaturas de envelhecimento (temperatura ambiente e 40°C).

Numa primeira parte de trabalho optimizaram-se as condições de análise dos compostos voláteis por GC-MS. Após optimização do método de preparação da amostra por microextração em fase sólida, foi utilizada uma fibra de DVB/CAR/PDMS, a uma temperatura de extracção de 40°C, durante 40 min e foram optimizadas as condições de análise cromatográfica.

Numa segunda parte do trabalho procedeu-se à análise de amostras reais de sumos e refrigerantes. Em termos gerais, observou-se que à temperatura ambiente, as amostras de sumos e de refrigerantes sofreram variações menores no perfil aromático quando em embalagem Tetrapak. A 40°C, as amostras de sumo tiveram um comportamento semelhante. Já no refrigerante, a perda em ácido ascórbico é muito menor na embalagem PET e para o perfil aromático a embalagem que sofre menores variações, é a Tetrapak. Todas as amostras para ambos os estudos de envelhecimento sofreram variações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Palavras-Chave:** sumos; refrigerantes; compostos voláteis; ácido ascórbico; envelhecimento; embalagens.

---

## Abstract

Volatile compounds were identified by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) and, it was determined the amount of ascorbic acid by high performance liquid chromatography (HPLC) present in juice samples and soft drinks in different types of packages, at different times and at different temperatures of ageing (approximately 22°C and 40°C). The freezing effect of the samples has also been tested.

After optimization of the sample preparation method by micro-extraction in the solid phase, a DVB/CAR/PDMS fibre was used at an extraction temperature of 40°C, during 40 min and were optimized the conditions in the chromatograph.

At room temperature, both beverages had suffered lower aromatic profile variations in Tetrapak package. At 40°C, juice packages react similarly concerning the ascorbic acid content as well as the aromatic profile, however, in the soft-drink, the loss in ascorbic acid is much lower in the PET package, and for the aromatic profile, Tetrapak is the package with lower variations. All of the samples, for both ageing studies, had statistically significant variations ( $p < 0,05$ ). At freezing temperatures a decrease in the compounds for all cases, is registered.

**Key words:** juices; soft drinks; volatile compounds; ascorbic acid; ageing; packages.

---

## Extended abstract

In this work it was used the analytical technique of gas chromatography connected to the mass spectrometry (GC-MS) to separate and identify the volatile compounds present in samples of fruit juices and soft drinks in different types of packages during the ageing process (natural and accelerated). Solid phase micro-extraction (SPME) was used to prepare the samples for analysis. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of ascorbic acid in the samples.

The experimental work was developed in two phases: first, it was necessary to optimize the analytical methods and sample preparation conditions and after, different samples subject to ageing were analysed.

During optimization of the SPME-GC-MS method, some analytical conditions in the chromatograph were changed, as well as in the preparation of sample by micro-GC method that gives better results in this kind of sample. The sample preparation by micro-extraction should be carried out with a DVB/CAR/PDMS fiber, at an extraction temperature of 40° C, during 40 mn.

After method optimization for GC-MS analysis, samples of orange juice stored in different packages, (monolayer PET and Tetrapak), and also fruit soft drinks samples, (in multi-layer PET and Tetrapak) were analyzed.

All the samples were subjected to different ageing conditions during different periods of time with storage at 40° C and storage at room temperature (approximately 21° C).

For the orange juice, the results obtained after SPME-GC-MS analysis showed that, for the samples in PET package and Tetrapak, volatile compounds responsible for the characteristic odour of the juice had suffered modifications during the juice ageing process, in particular: nonanal,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpinoleno,  $\alpha$ -terpineol octanal, linalol, 2- $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -*p*-dimetilestireno and geraniol. After aging at 40°C these variations were very similar in both types of package. After 60 days at room temperature all compounds suffered a reduction in their concentration in both packages. Lower variations in concentrations of compounds were observed for samples taken from tetrapak packages.

---

For the soft drink, the volatile compounds which determine its specific fragrance were ethyl hexanoate, valencene, 1-hexanol, 2-pentanol acetate,  $\alpha$ -terpineol, ethylbutanoate, terpinolene, hexylacetate, decanal, hexyl butirate, linalool, mircene and  $\alpha$ -pinene. In the samples proceeding from the Tetrapak packages aged at 40°C, a compound appeared after 3 days. This compound, furfural is known to contribute to the off flavour of soft drinks. Furfural was detected at room temperature in both packages, although for PET packages the concentration was higher than in Tetrapak packages. Another compound,  $\alpha$ -terpineol was detected in both packages during the aging at 40°C.

Significant differences in the aromatic profile were detected ( $p < 0,05$ ) among the samples.

It was possible to monitor the decrease in ascorbic acid concentration in all juices in the different packages when samples were analysed by HPLC. For orange juice there was a decrease of 10% for juices for the PET packages and of 9% for the Tetrapak packages. For Bongo soft drink, there was a decrease of 27% for the Tetrapak packages and 22% for the PET packages.

---

## ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	III
ABSTRACT .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE TABELAS .....	XIII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	XIV
<b>I. ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS.....	1
2. SUMOS E REFRIGERANTES .....	3
2.1 <i>Sumos de citrinos</i> .....	3
2.2 <i>Refrigerante à base de sumos</i> .....	7
3. EMBALAGEM PARA SUMOS E REFRIGERANTES .....	7
3.1 <i>Embalagem rígida</i> .....	8
3.1.1 Embalagens de politereftalato de etileno .....	8
3.1.2 Vidro .....	9
3.2 <i>Embalagem semi-rígida de complexo laminado</i> .....	9
4. PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DE SUMOS .....	10
4.1 <i>Evolução do perfil aromático durante e após o processamento industrial dos sumos</i> .....	11
5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL AROMÁTICO DE SUMOS E REFRIGERANTES .....	15
5.1 <i>Microextracção em fase sólida (MEFS/SPME)</i> .....	16
5.2 <i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)</i> .....	17
5.3 <i>Análise de ácido ascórbico por HPLC</i> .....	19
<b>II DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1 OPTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>21</b>
1.1 <i>Amostras analisadas</i> .....	21
1.2 <i>Preparação das amostras</i> .....	21
1.3 <i>Equipamento e condições de análise</i> .....	22
2. METODOLOGIAS .....	22
2.1 <i>Desenvolvimento de metodologias analíticas</i> .....	22
2.1.1. <i>Variação das condições de análise no cromatógrafo de fase gasosa (GC)</i> .....	23
2.1.2. <i>Variação das condições de preparação de amostra por MEFS</i> .....	24
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
3.1 <i>Optimização das condições de análise cromatográfica</i> .....	25
3.2 <i>Optimização das condições de preparação de amostra por MEFS</i> .....	27

3.2.1 Escolha do tipo de fibra.....	27
3.2.2 Optimização da temperatura de extracção .....	28
3.2.3 Optimização dos tempos de extracção.....	28
4. ESCOLHA DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE .....	29
<b>II.2 ESTUDO DO ENVELHECIMENTO DE SUMOS E REFRIGERANTES.....</b>	<b>30</b>
2.1 Amostras analisadas.....	30
2.2. <i>Análise dos compostos voláteis</i> .....	31
2.2.1. Preparação das amostras .....	31
2.2.2. Equipamento e condições de análise .....	31
2.3 <i>Análise do teor de vitamina C</i> .....	31
2.3.1 Preparação das amostras.....	31
2.3.2 Equipamento e condições de análise .....	32
2.4 <i>Tratamento estatístico dos resultados</i> .....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
3.1 <i>Análise de compostos voláteis no Sumo Fresh laranja 100%</i> .....	33
3.1.1 Envelhecimento acelerado à temperatura de 40°C para amostras em embalagem PET e Tetrapak.....	33
3.1.2 Envelhecimento à temperatura ambiente para amostras em embalagem PET e Tetrapak.....	37
3.1.3 Estabilidade da amostra após congelação .....	41
3.2 <i>Análise de ácido ascórbico no sumo Fresh laranja 100%, à temperatura de 40°C</i> .....	41
3.3 <i>Análise de compostos voláteis no refrigerante Bongo</i> .....	43
3.3.1 Envelhecimento acelerado à temperatura de 40°C para amostras em embalagem PET e Tetrapak.....	43
3.3.2 Envelhecimento à temperatura ambiente para amostras em embalagem PET e Tetrapak.....	47
3.3.3 Estudo de composição volátil das amostras após congelação .....	51
3.4 <i>Análise de ácido ascórbico no refrigerante Bongo à temperatura de 40°C em embalagem PET e Tetrapak</i> .....	52
<b>III CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
SITES CONSULTADOS .....	58
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>59</b>
APÊNDICE I – OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO CROMATÓGRAFO.....	60
<i>Figura 35 – Cromatogramas referentes ao refrigerante “B!Limonada” em diferentes condições de análise .....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 36 - Cromatogramas referentes ao sumo de Maçã, com 3 razões de split diferentes e em splitless .....</i>	<i>60</i>



APÊNDICE II – OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA PREPARAÇÃO DA AMOSTRA POR MEFS.....	61
APÊNDICE III - ENSAIOS DE REPETIBILIDADE .....	62
<i>Tabela 12 – Áreas totais dos compostos presentes no Sumo de laranja</i> .....	62
<i>Tabela 14 - Áreas totais dos compostos presentes no refrigerante Bongo</i> .....	63
APÊNDICE IV – RESULTADOS DA EVOLUÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS AO LONGO DO TEMPO	
PRESENTES NO SUMO FRESH 100% DE LARANJA.....	64
<i>Tabela 15 – Embalagem PET a 40°C</i> .....	64
<i>Tabela 16 - Embalagem Tetrapak a 40 °C</i> .....	65
<i>Tabela 17 - Resumo das variações sofridas nos compostos das amostras das embalagens PET e Tetrapak a 40°C</i> .....	66
<i>Tabela 18 - Embalagem PET à temperatura ambiente</i> .....	66
<i>Tabela 19 - Em embalagem Tetrapak à temperatura ambiente</i> .....	67
<i>Tabela 20 - Resumo das variações sofridas nos compostos das amostras das embalagens PET e Tetrapak à temperatura ambiente</i> .....	67
APÊNDICE V – TRATAMENTO ESTATÍSTICO PARA O SUMO DE LARANJA: ANÁLISE DE VARIÂNCIAS DOS RESULTADOS DO ESTUDO DE ENVELHECIMENTO (ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA/MANOVA – TESTE FISHER LSD, LETRAS DIFERENTES CORRESPONDEM A AMOSTRAS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA UM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%) .....	68
<i>Tabela 21 - Teste F para os principais compostos presentes nas amostras de sumo de laranja em embalagem PET, à temperatura de 40°C</i> .....	68
<i>Tabela 22 - Teste F para os principais compostos presentes no sumo de laranja em embalagem TP, à temperatura de 40°C</i> .....	68
<i>Tabela 23 - Teste F para os principais compostos presentes no sumo de laranja em embalagem TP, à temperatura ambiente</i> .....	69
<i>Tabela 24 - Teste F para os principais compostos presentes no sumo de laranja em embalagem PET, à temperatura ambiente</i> .....	69
APÊNDICE VI - TRATAMENTO ESTATÍSTICO PARA O REFRIGERANTE BONGO: ANÁLISE DE VARIÂNCIAS DOS RESULTADOS DO ESTUDO DE ENVELHECIMENTO (ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA/MANOVA – TESTE FISHER LSD, LETRAS DIFERENTES CORRESPONDEM A AMOSTRAS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA UM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%) .....	70
<i>Tabela 25 - Teste F para os principais compostos presentes no refrigerante Bongo em embalagem PET, à temperatura de 40°C</i> .....	70
<i>Tabela 26 - Teste F para os principais compostos presentes no refrigerante Bongo em embalagem TP, à temperatura de 40°C</i> .....	70
<i>Tabela 27 - Teste F para os principais compostos presentes no refrigerante Bongo em embalagem PET, à temperatura ambiente</i> .....	71
<i>Tabela 28 - Teste F para os principais compostos presentes no refrigerante Bongo em embalagem TP, à temperatura ambiente</i> .....	71
APÊNDICE VII – EFEITO DAS TEMPERATURAS DE CONGELAÇÃO NA ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DE SUMO DE LARANJA.....	72

---

<b><i>Tabela 29 - Resultados das Áreas médias totais obtidas para cada tempo de envelhecimento e cada tempo de congelção</i></b> .....	72
<b>APÊNDICE VIII – TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTE NAS AMOSTRAS DE SUMO DE LARANJA À TEMPERATURA DE 40°C</b> .....	73
<b><i>Tabela 30 - Média das áreas obtidas para as amostras de sumo de laranja embaladas em Tetrapak e PET para cada tempo de envelhecimento estudado</i></b> .....	73
<b>APÊNDICE IX – RESULTADOS DA EVOLUÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS AO LONGO DO TEMPO PRESENTES NO REFRIGERANTE BONGO</b> .....	74
<b><i>Tabela 31 - Em embalagem Tetrapak à temperatura de 40°C</i></b> .....	74
<b><i>Tabela 32 - Em embalagem PET à temperatura de 40°C</i></b> .....	75
<b><i>Tabela 33 - Resumo das variações sofridas nos compostos das amostras das embalagens PET e Tetrapak à temperatura de 40°C</i></b> .....	76
<b><i>Tabela 34 - Em embalagem PET à temperatura ambiente</i></b> .....	76
<b><i>Tabela 35 - Em embalagem Tetrapak à temperatura ambiente</i></b> .....	77
<b><i>Tabela 36 - Resumo das variações sofridas nos compostos das amostras das embalagens PET e Tetrapak à temperatura ambiente</i></b> .....	77
<b>APÊNDICE X – EFEITO DAS TEMPERATURAS DE CONGELAÇÃO NA ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DO REFRIGERANTE BONGO</b> .....	78
<b><i>Tabela 37 - Resultados das Áreas médias totais obtidas para cada tempo de envelhecimento e cada tempo de congelção</i></b> .....	78
<b>APÊNDICE XI – TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTE NAS AMOSTRAS DO REFRIGERANTE BONGO À TEMPERATURA DE 40°C</b> .....	79
<b><i>Tabela 38 - Média das áreas obtidas para as amostras do refrigerante Bongo embaladas em Tetrapak e PET para cada tempo de envelhecimento estudado</i></b> .....	79

---

## Índice de Figuras

Figura 1 - Morfologia do fruto de um citrino .....	4
Figura 2 – Estrutura da vitamina C ( $C_6H_8O_6$ ).....	5
Figura 3 – Oxidação da vitamina C .....	6
Figura 4 - Fluxograma geral do processo para preparação e enchimento asséptico de sumos de frutos. ....	11
Figura 5 – Formação de $\alpha$ -terpineol através do linalol e do limoneno. ....	13
Figura 6 - Algumas reacções de biodegradação do limoneno .....	13
Figura 7 – Estrutura química do furfural .....	14
Figura 8 - Ilustração esquemática do método HS-SPME. ....	17
Figura 9 – Esquema de GC-MS .....	18
Figura 10 - Comparação dos cromatogramas obtidos na análise de de amostras de Fresh Laranja em embalagem Tetrapak utilizando diferentes condições .....	25
Figura 11 - Comparação dos três cromatogramas de amostras de sumo de laranja com duas razões de split: 1:5 e 1:10, e em modo splitless.....	26
Figura 12 – Comparação das áreas dos picos quando se utilizaram as fibras de DVB/CAR/PDMS (fibra cinzenta) e PDMS (fibra encarnada) para os principais compostos presentes no sumo de laranja.....	27
Figura 13 - Evolução da área total dos picos detectados em função dos diferentes tempos de extracção .....	29
Figura 14 - Variação das áreas médias dos compostos responsáveis por <i>flavour</i> em função do tempo de envelhecimento em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão) .....	33
Figura 15 – Evolução do $\alpha$ -terpineol em função das variações do $\alpha$ -pineno e do linalol, em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão) .....	34
Figura 16 – Variação das áreas médias dos compostos responsáveis por <i>flavour</i> em função do tempo de envelhecimento em embalagem Tetrapak ( $\pm$ desvio padrão) .....	35
Figura 17 - Evolução e comparação de possíveis <i>off flavours</i> nos sumos de laranja embalados em PET e Tetrapak ( $\pm$ desvio padrão) .....	37
Figura 18 – Variação das áreas médias dos compostos responsáveis pelos possíveis <i>off- flavours</i> no sumo de laranja em PET e Tetrapak ao longo do tempo de envelhecimento natural ( $\pm$ desvio padrão) .....	38
Figura 19 - Variação dos compostos de <i>flavour</i> presentes nos sumos de laranja em PET ao longo do tempo de envelhecimento natural ( $\pm$ desvio padrão) .....	39
Figura 20 - Variação das áreas médias dos compostos responsáveis por <i>flavours</i> no sumo de laranja em Tetrapak ao longo do tempo de envelhecimento natural.....	40
Figura 21 – Áreas médias totais em função do tempo de congelação ( $\pm$ desvio padrão).41	
Figura 22 - Evolução de ácido ascórbico ao longo do tempo de envelhecimento em PET e Tetrapak.....	42

---

Figura 23 - Variação das áreas médias de alguns compostos responsáveis por <i>flavours</i> do refrigerante Bongo em função do tempo de envelhecimento em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão).....	43
Figura 24 - Variação das áreas médias de alguns compostos responsáveis por <i>flavours</i> do refrigerante Bongo em função do tempo de envelhecimento em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão).....	44
Figura 25 – Evolução do $\alpha$ -pineno, linalol em função das variações do do $\alpha$ -terpineol, em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão).....	45
Figura 26 - Variação das áreas médias do butanoato de etilo em função do tempo de envelhecimento em embalagem Tetrapak.....	45
Figura 27 - Variação das áreas médias de alguns compostos responsáveis por <i>flavour</i> no refrigerante bongo em função do tempo de envelhecimento em embalagem Tetrapak.....	46
Figura 28 – Evolução de possíveis <i>off flavours</i> presentes no refrigerante Bongo em embalagem TP. ....	47
Figura 29 – Variação dos principais compostos presentes no Bongo envelhecidos à temperatura ambiente em embalagem PET .....	48
Figura 30 - Evolução de possíveis <i>off flavours</i> presentes no refrigerante Bongo envelhecido temperatura ambiente em embalagem PET e Tetrapak .....	49
Figura 31 – Evolução do butanoato de etilo presente no refrigerante Bongo envelhecido à temperatura ambiente em embalagem TP .....	49
Figura 32 - Variação dos principais compostos presentes no Bongo envelhecidos em embalagem Tetrapak à temperatura ambiente.....	50
Figura 33 – Efeito do congelamento no Bongo .....	51
Figura 34 – Comparação da variação de ácido ascórbico no Bongo, ao longo do tempo de envelhecimento nas duas embalagens PET e Tetrapak. ....	52

---

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais características das garrafas PET .....	9
Tabela 2 - Limiares de detecção olfactiva para alguns compostos em solução/emulsão aquosa .....	14
Tabela 3 - Especificações das fibras utilizadas para a optimização de métodos .....	21
Tabela 4 - Gradientes de temperatura usados no forno do cromatógrafo e modo de injeção .....	23
Tabela 5 – Variação das condições de temperatura e tempo de análise cromatográfica e de extracção por MEFS .....	24
Tabela 6 - Áreas totais, média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) das áreas obtidas após concentração das amostras a T= 35°C e 40°C .....	28
Tabela 7 - Condições de análise a utilizar no estudo de envelhecimento de sumos e refrigerantes .....	29
Tabela 8 – Periodicidade do envelhecimento do sumo de laranja Fresh e do refrigerante Bongo.....	30
Tabela 9 – Periodicidade da congelação.....	31

---

## Abreviaturas e Símbolos

**ANIRSF** - associação Nacional dos Industriais de Refrigerantes e Sumos de Frutos

**DPR** – desvio padrão relativo

**DVB/CAR/PDMS** - divinilbenzeno/Carboxeno/ Polidimetilsiloxano

**FID** – detector de ionização de chama

**GC** – cromatografia gasosa

**GC-MS** – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

**(HS) – SPME** – microextração em fase sólida em espaço de cabeça

**HPLC** – cromatografia líquida de alta eficiência

**IS** – índice de semelhança

**IR** – índice de retenção

**IFST** – Institute of Food Science and Technology

**MEFS** – microextração em fase sólida

**P/V** – peso/volume ou massa/volume

**PET** - politereftalato de etileno

**TP** - tetrapak

# I. Enquadramento teórico

## 1. Introdução e objectivos

Sempre se considerou a fruta como um alimento indispensável para uma alimentação saudável e equilibrada. É uma fonte rica em vitaminas, minerais e fibras que são essenciais para o crescimento, funcionamento e desenvolvimento do ser humano.

O consumidor está cada vez mais exigente na escolha de um produto e tenta conciliar a procura de um produto saudável, de preferência sem corantes e conservantes e que seja um produto de elevada qualidade sensorial, esperando que esta se mantenha com o mínimo de alterações indesejáveis desde a saída da fábrica ao consumo propriamente dito, dentro do seu prazo de validade.

Estudos realizados aos hábitos alimentares da sociedade actual mostram que grande parte da população tem uma alimentação quotidiana em que os frutos e vegetais representam apenas uma pequena percentagem (**Madeira et al, 2000**). Esta baixa tendência de consumo de frutos, poderá ser explicada pelo ritmo de vida acelerado preferindo-se produtos “prontos a consumir”. Este facto impulsionou as indústrias a aumentarem a produção de sumos de fruta. As estatísticas indicam que o mercado de bebidas à base de fruta constitui um dos sectores com maiores perspectivas de crescimento dentro do mercado das bebidas. Nas últimas duas décadas, o mercado de bebidas à base de fruta, sofreu um acréscimo de 10% por ano (**Lund, 2000**). De acordo com alguns estudos recentes da ANIRSF (Associação Nacional dos Industriais de Refrigerantes e Sumos de Frutos), de 2007 para 2008, o mercado dos sumos de frutos e néctares cresceu cerca de 3,5%. Os sumos apresentaram uma evolução positiva de 11,4% e o segmento dos néctares cresceu 1,2%.

Para além da cor, a característica chave na produção de sumos é a obtenção de um **flavour** o mais semelhante possível a um sumo de fruta natural acabado de produzir. O **flavour** pode ser definido como um conjunto complexo das sensações olfactivas, gustativas ou trigemiais perceptíveis durante a degustação. Pode ser influenciado por impressões tácteis, térmicas, álgicas e/ou cinestésicas (**Projecto de Norma Portuguesa, 1994**). Alterações na qualidade dos sumos de fruta durante o armazenamento estão normalmente correlacionadas com a perda de nutrientes, escurecimento e o desenvolvimento de defeitos no produto, ou seja, resultam na perda original do **flavour** e no desenvolvimento de compostos que vão contribuir para o *off-*

---

*flavour* designado em português por *flavour* atípico. O desenvolvimento destes compostos é afectado maioritariamente pela **temperatura** e **tempo de armazenamento** (Cohen, 1986). No entanto, para além destes, há outros factores que podem ter grande influência no tipo de alterações ao longo do tempo de prateleira do mesmo, nomeadamente a qualidade da matéria-prima, o valor do pH e da acidez total, o potencial redox e disponibilidade de oxigénio, o tipo de tratamento térmico e as condições gerais do processamento, o tipo de embalagem escolhida, composição da atmosfera dentro da embalagem e as condições de armazenagem (Kilcast, 2000).

Segundo as directrizes do IFST (1993) o **tempo de prateleira** dum produto pode ser definido como o período de tempo em que o produto, quando armazenado sob as condições recomendadas, continua:

- a ser seguro, isto é, não constitui nenhum perigo para o consumidor;
- a ter certas características desejadas, nomeadamente sensoriais, químicas, físicas, e microbiológicas;
- a manter a composição nutricional mencionada no rótulo,

O tempo de prateleira deve ser estabelecido após avaliações feitas por painéis de análise sensorial e análises efectuadas com metodologias instrumentais adequadas ao estudo dos compostos mais importantes para a manutenção das características dos produtos.

As **embalagens** usadas em produtos alimentares e bebidas têm sofrido grandes transformações nas últimas décadas, pelo aparecimento de novos materiais e novas tecnologias. A embalagem primária, isto é, a que está em contacto directo com o alimento, tem como função primordial fornecer ao consumidor um alimento de qualidade igual ao acabado de produzir (Castro, 2002). Dentro dos materiais de plástico utilizados para armazenamento e embalagem de sumos e refrigerantes, as embalagens de politereftalato de etileno (PET) são as mais utilizadas. No entanto, ao longo do tempo há absorção de compostos aromáticos para o polímero resultando na perda dos mesmos e originando um perfil aromático desajustado. Para além disso, as embalagens PET são permeáveis ao oxigénio. Recentemente têm surgido novas tecnologias, como a introdução de barreiras que tendem a diminuir a passagem de oxigénio, as embalagens activas com incorporação de substâncias que vão fixar o



---

oxigénio, para prolongar o tempo de prateleira e limitar as reacções de oxidação que possam ocorrer no produto (**Berlinet et al, 2005** e **Mergen, 2003**).

Atendendo ao marcado impacto do tipo de embalagem e das condições de armazenamento no tempo de prateleira de sumos e refrigerantes o presente trabalho teve por **objectivo** geral o estudo da influência de dois tipos de embalagem no perfil aromático e no teor de ácido ascórbico de sumos e refrigerantes mantidos a duas temperaturas e durante diferentes períodos de tempo. O estudo incidiu sobre amostras de sumo Fresh Laranja 100%, armazenadas em PET monocamada e em Tetrapak, e de refrigerante Bongo 8 frutos, armazenados em PET multicamada e em Tetrapak. A componente aromática e o teor de ácido ascórbico de produtos sujeitos a diferentes tempos/temperaturas de “envelhecimento acelerado” constituíram as variáveis dependentes estudadas.

## 2. Sumos e Refrigerantes

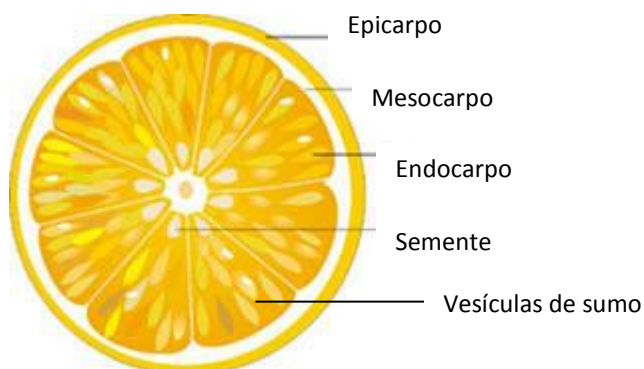
A Directiva da Comunidade Europeia define os sumos de fruta, como sumos que são extraídos de frutos por processos mecânicos, tendo as características de aroma, cor, e *flavour* típicas do fruto em questão (**Pollard, 1990 cit in Lund et al, 2000**).

Os refrigerantes são fundamentalmente constituídos por água (cuja concentração normalmente é superior a 80%), açúcares ou adoçantes, sumos e polpas de frutas, aromas, corantes, conservantes e dióxido de carbono (nas bebidas carbonatadas) (**Lidon, 2007**).

### 2.1 Sumos de citrinos

O principal componente dos citrinos é, evidentemente, a água que está presente numa percentagem geralmente superior a 80%. Por ordem de importância seguem-se os açúcares, os ácidos (especialmente ácido cítrico), as proteínas, as substâncias minerais, entre outros compostos. Estas substâncias não estão distribuídas uniformemente por todo o fruto e por isso nas diferentes partes do fruto (fig 1) a composição química difere. Assim, no **epicarpo** ou **flavedo**, encontram-se o pigmento verde (a clorofila) e nos frutos maduros, os pigmentos corados (carotenos, xantofilas, etc), bem como os óleos essenciais. O **mesocarpo** ou **albedo**, é rico em açúcares estruturais como substâncias pécticas, celulose e hemicelulose, glucósidos e vitamina C. No **sumo** (parte principal do **endocarpo**) existem açúcares solúveis, ácidos,

pectinas, pigmentos, vitaminas e sais minerais. Por fim, **nas sementes** ocorrem quantidades relativamente elevadas de proteínas e de óleos essenciais (Amaral, 1994, cit in Antunes, 2006)



**Figura 1 - Morfologia do fruto de um citrino**

Para além destes componentes, o oxigénio, o azoto e o dióxido de carbono estão presentes nos frutos, encontrando-se nos espaços intercelulares dos tecidos. Durante o esmagamento das células que ocorre durante a extracção do sumo, estes gases são misturados com os constituintes das células ocorrendo **reacções oxidativas** (Shaw *et al*, 1993). A ruptura celular implica ainda o contacto entre enzimas e substratos o que conduz a acentuadas alterações físicas, químicas e sensoriais do sumo.

As **enzimas** presentes nos sumos catalisam reacções de degradação de polímeros como a pectina, o que afecta a estabilidade física dos mesmos ou reacções de oxidação, implicando alterações de cor, gosto e/ou aroma.

Para além das alterações físicas, químicas e sensoriais passíveis de ocorrer nos produtos derivados de citrinos, pode ainda ocorrer desenvolvimento microbiano, principalmente leveduras fermentativas, como *Sacharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*, ou bactérias lácticas como *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, ou ainda espécies de *Acetobacter* e *Gluconobacter*. As *Sacharomyces cerevisiae* são os agentes de alteração mais comuns nos sumos refrigerados e produzem elevadas quantidades de CO<sub>2</sub> e etanol. As *Zygosaccharomyces bailii* também são um dos principais organismos de alteração devido à sua fisiologia e elevada resistência a conservantes químicos (Lund *et al*, 2000). Os *lactobacillus* e *leuconostoc* são responsáveis pelo aparecimento de um *off flavour* com cheiro a manteiga devido à produção de diacetilo. Este *off flavour* pode ser usado como um indicador de

estabilidade microbiológica durante o processamento. O teor limite de 0,8 ppm de diacetilo foi estabelecido como valor limite para indicar quando uma linha de processamento deve ser descontaminada (Shaw *et al.*, 1993)

Os **citrinos** são ricos em vitaminas, sobretudo em vitamina C ou **ácido L-ascórbico** (**fig. 2**). A vitamina C, não obstante ser muito sensível a factores externos como o oxigénio, a luz e a temperatura, pode encontrar-se nos sumos, mesmo após pasteurização, em percentagens, de 92-98% do seu teor inicial. Tem um efeito estabilizador, anti-oxidante prevenindo o escurecimento e a descoloração, aumentando assim o tempo de prateleira de um alimento ou bebida, nomeadamente sumos ou refrigerantes (Shaw *et al.*, 1993). A vitamina C, em presença do **oxigénio** do ar ou **calor** pode sofrer degradação, processo designado por oxidação. Assim, o teor de vitamina C pode diminuir acentuadamente quando os sumos são conservados a temperaturas relativamente elevadas, nomeadamente a partir dos 27°C, mesmo em condições anaeróbias (Pessanha, 2004). Em embalagens hermeticamente fechadas a degradação da vitamina C ocorre, fundamentalmente por via anaeróbia, numa reacção de natureza não enzimática que dá origem ao furfural. Outros factores como o **pH**, presença de **iões metálicos** e o material de **embalagem** podem também contribuir para a perda da vitamina C nos sumos (Marshall *et al.*, 1985, *cit in* Pessanha, 2004). O teor máximo em ácido ascórbico nos sumos **não deverá exceder 100mg/L** (Lidon, 2007). A vitamina C é muitas vezes usada como índice de qualidade nutricional dos produtos derivados de frutas e vegetais porque, comparada a outros nutrientes, esta vitamina é a mais sensível à degradação durante o processamento e subsequente armazenamento, perdendo a sua actividade biológica (Ozkan, 2004).

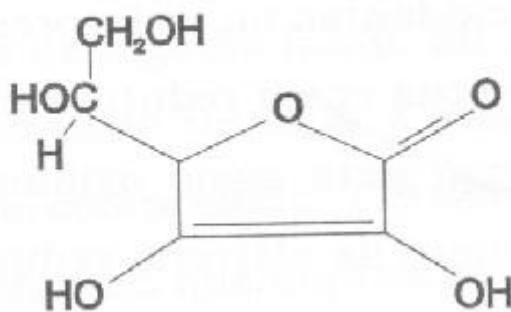
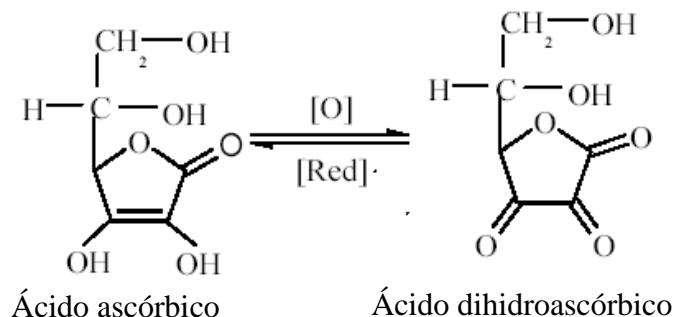


Figura 2 – Estrutura da vitamina C (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>)

A oxidação dos alimentos pode envolver a adição de um átomo de oxigénio ou ocorre a remoção de um átomo de hidrogénio, das moléculas em determinados compostos que estão presentes nos alimentos (Lidon, 2007). Os compostos antioxidantes atrasam o processo de oxidação mas não os impedem totalmente. A utilização de vários antioxidantes em simultâneo pode ser importante de forma a obter uma acção sinérgica.



**Figura 3** – Oxidação da vitamina C

Fonte: adaptado de <http://www.quimica.ufpr.br/eduquim/pdf/experimento3.pdf>

O sumo de laranja é o sumo de fruta mais procurado a nível mundial (Shaw *et al*, 1993), no entanto apresenta graves problemas de instabilidade física e de *flavour*. O *flavour* do sumo é devido à existência de uma mistura complexa de compostos voláteis aprisionados numa matriz de sólidos insolúveis, açúcares e ácidos que facilmente se altera durante o tratamento térmico e armazenamento. (Selli *et al*, 2004 cit in Bronze).

Sob o ponto de vista físico, o sumo de laranja é um sistema heterogéneo de duas fases. Uma delas consiste numa fase aquosa límpida amarela pálida que contém compostos solúveis (açúcares e ácidos orgânicos, compostos corados, vitaminas e compostos do aroma). A outra fase, é uma fase insolúvel em água, constituída por uma rede tridimensional à base de pectinas com tamanhos que podem variar entre os 0,05µm e os 100µm. A esta fase insolúvel em água dá-se o nome de "cloud" ou turvação. As partículas insolúveis contribuem para incrementar o *flavour*, a cor e a consistência dos sumos sendo importante a sua manutenção até ao consumo (Antunes, 2006). No entanto, se não se verificar uma adequada inactivação enzimática durante o processamento, pode verificar-se durante o armazenamento a "destruição" da rede péctica com formação de depósito (maioritariamente formado por pectatos de cálcio) e de uma fase sobrenadante, o que constitui um defeito neste tipo de produto.

---

## 2.2 Refrigerante à base de sumos

A produção de refrigerantes à base de sumos resulta da mistura de água, sumo de frutos, adoçantes, aromatizantes naturais e/ou artificiais, dióxido de carbono, e aditivos como agentes conservantes, emulsionantes e estabilizadores. O nível de sólidos solúveis totais deverá ser igual ou superior a 8%. Os refrigerantes podem ainda conter corantes naturais (Lidon, 2007).

Os refrigerantes que não contêm dióxido de carbono, são mais sensíveis a contaminações. A sua estabilidade microbiológica é fornecida pelas boas práticas de higienização e baixo pH (<4.5) bem como um processo eficaz de pasteurização seguido por enchimento asséptico (Lidon, 2007).

## 3. Embalagem para sumos e refrigerantes

Os materiais de embalagem para sumos e refrigerantes devem estar em conformidade com a legislação comunitária dos materiais em contacto com géneros alimentícios. As bebidas podem ser embaladas em embalagens rígidas (vidro, plástico, principalmente politereftalato de etileno e alumínio), ou semi-rígidas (complexos laminados, principalmente Tetrapak ou em bolsas de plástico de diferentes tamanhos). Podem ser comercializados em embalagens individuais ou embalagens múltiplas (ANIRSF).

A embalagem visa conservar os alimentos e fornecer informação ou contribuir para a promoção de *estratégias de marketing*. A escolha de uma embalagem deve atender ao tipo de alimento de forma a minimizar/anular as hipóteses de migração de compostos do material de embalagem para o alimento ou adsorção de compostos do alimento (nomeadamente compostos do aroma) pela embalagem. A migração de compostos da embalagem para o alimento, ou a adsorção de compostos do alimento pela embalagem, pode levar ao surgimento de problemas toxicológicos ou sensoriais, podendo afectar também as propriedades mecânicas da própria embalagem. A embalagem deve ainda ser adequada no que respeita a permeabilidade ao vapor de água, ao oxigénio e ao dióxido de carbono no caso de produtos carbonatados, e à maior ou menor protecção à exposição à luz.

---

Para além da embalagem propriamente dita, a operação unitária de enchimento pode comprometer a estabilidade física, química, microbiológica e sensorial dos produtos. Assim, no caso de se optar pela esterilização/pasteurização prévia do alimento, é importante manter/promover a assepsia do enchimento e materiais de embalagem, ou através de enchimento em condições de assepsia ou enchimento e fecho da embalagem seguido de nova fase de esterilização (Irwin 1998) e (Willige, 2002).

De salientar que na empresa onde foi realizado este estudo, a gama de produtos que se estudou não utiliza adição de conservantes, pelo que a conservação é garantida pela pasteurização dos produtos e enchimento por técnicas adequadas a manter/promover assepsia. Em particular nesta empresa, o enchimento é realizado a quente em embalagens de vidro, com fase posterior de esterilização/arrefecimento da embalagem cheia e fechada; ou o enchimento é realizado a frio (temperatura ambiente) em condições assépticas, neste caso em embalagens PET e cartão complexo (normalmente designado por embalagens Tetrapak por ser o nome do fornecedor das embalagens/máquina de enchimento).

No presente trabalho avaliaram-se/compararam-se produtos em embalagens PET e cartão complexo, ambas cheias assepticamente na unidade industrial de Almeirim.

### **3.1 Embalagem rígida**

#### **3.1.1 Embalagens de politereftalato de etileno**

As embalagens de plástico são muito usadas na indústria alimentar devido ao seu baixo custo, à sua leveza, a serem resistentes à quebra e a requererem menor energia para o fabrico e transporte do que por exemplo as embalagens de vidro (Irwin, 1998).

De entre as embalagens de plástico as embalagens de politereftalato de etileno (PET) são das mais utilizadas para bebidas não alcoólicas. Estas embalagens **PET** são fabricadas por um processo de sopro-biorientado, técnica que permite quer aumentar a tenacidade do material e, por conseguinte, promover uma maior resistência à ruptura, quer baixar a permeabilidade ao CO<sub>2</sub> e, portanto, aumentar o período de vida útil da bebida (Castro, 2002).

A embalagem de plástico estudada no presente trabalho foi a embalagem obtida a partir do politereftalato de etileno (PET) monocamada e PET multicamada (PET, nylon e absorvedor de oxigénio /PET). Estudos realizados sobre a permeabilidade ao

---

oxigénio nos dois tipos de embalagens PET de 0,33L mostram que a embalagem PET monocamada é cerca de 10 vezes mais permeável ao oxigénio do que a embalagem PET multicamada (Tabela 1) (**Berlinet et al, 2005**).

**Tabela 1 - Principais características das garrafas PET**

<b>Embalagem</b>	<b>Composição</b>	<b>Permeabilidade ao oxigénio em U (<math>1\text{ U} = 10^{-20}\text{ Kg/m/s/Pa}</math>)</b>	<b>Densidade Kg/m3</b>
Monocamada	PET	6,79	1350-1360
Multicamada	PET/nylon-absorvedor de oxigénio/PET	0,62	1200-1250

Fonte: Berlinet et al, 2005

### **3.1.2 Vidro**

As embalagens de vidro possuem uma elevada inércia química, impermeabilização a líquidos e gases, não alteram gostos ou cheiros e podem ser transparentes ou opacas. Estas embalagens são resistentes a choques térmicos (embora moderados), acções mecânicas, e pressões internas (**Lidon, 2007**). Para além do referido o vidro é um material de fácil de limpeza e esterilização, que permite ser reciclado indefinidamente.

### **3.2 Embalagem semi-rígida de complexo laminado**

As embalagens semi-rígidas de complexos laminados são constituídas por papel ( $\approx 80\%$  do total da embalagem), polietileno e, no caso das embalagens assépticas, película de alumínio. A combinação destes materiais varia de caso para caso, conforme o produto a embalar, mas, em todos os casos o único material que entra em contacto com o alimento é o polietileno. O papel exerce função estrutural, conferindo rigidez à embalagem. O polietileno torna-a impermeável aos líquidos e a película de alumínio não só isola o produto do oxigénio e da luz, como também facilita a selagem, permitindo que esta se faça por indução de calor (**Castro, 2002**).

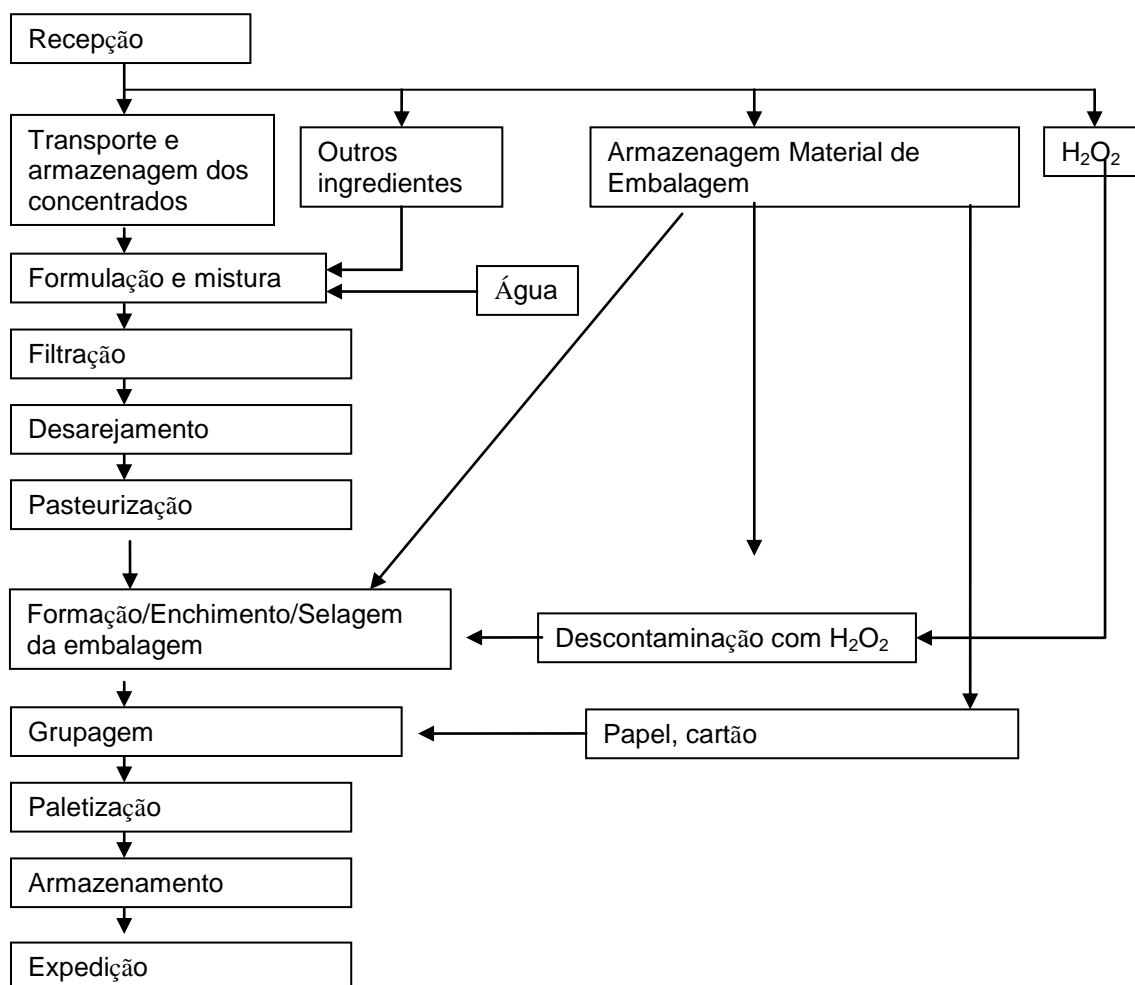
---

#### 4. Processamento industrial de sumos

Dado que os frutos são alimentos perecíveis, e o seu processamento é sazonal, tecnologias de processamento que permitam a sua conservação apresentam-se de todo o interesse. O processamento de frutos em sumos concentrados permite o consumo durante todo o ano. Com a concentração do sumo de fruta obtemos uma maior densidade e um volume menor, originando uma economia de custo devido à redução dos materiais para embalagem, ao espaço de armazenamento, ao transporte e à energia consumida. Para além disso, os produtos concentrados são mais estáveis e a sua qualidade é melhor mantida. O concentrado dos sumos de fruta pode ser usado tanto para reconstituição de um sumo fora da estação como para a produção de refrigerantes (**Shaw et al, 1993**).

Os sumos e refrigerantes estudados neste trabalho são produzidos a partir de concentrados. Na **figura 4** está representado um exemplo de produção industrial de sumos obtidos a partir de concentrados com enchimento asséptico.





**Figura 4 - Fluxograma geral do processo para preparação e enchimento asséptico de sumos de frutos.**

Fonte: adaptado de

[http://extranet.anirsf.pt/upload/documentos/203\\_Higiene\\_HACCP\\_RSF\\_ANIRSF.pdf](http://extranet.anirsf.pt/upload/documentos/203_Higiene_HACCP_RSF_ANIRSF.pdf)

#### 4.1 Evolução do perfil aromático durante e após o processamento industrial dos sumos

O aroma dos sumos de frutos é função da respectiva composição volátil. No caso do **sumo de laranja**, o aroma típico é atribuído aos álcoois (cerca de 22%), hidrocarbonetos (22%), ésteres (20%) e aos aldeídos (18%) considerando apenas o número de componentes envolvidos. Já foram identificados mais de 200 compostos voláteis em sumo de laranja (Shaw *et al*, 1993). Entre estes compostos, o **citral**, **limoneno**, **linalol**,  **$\alpha$ -pineno**, **butanoato de etilo**, **acetaldeído**,  **$\alpha$ -terpinoleno**, **2- $\beta$ -pineno**, **valenceno**, **geraniol**, **nonanal**, **octanal**, **decanal**, **mirceno**, **terpinoleno**, **octanol** e o **nonanol**, foram identificados como os que mais contribuem para o *flavour* típico a laranja e podem ser usados no estudo de autenticação do mesmo (K.

---

Robards, M. Antolovich, *Analyst* **120**, 1995, cit in Gómez-Ariza, 2004), (Berlinet *et al*, 2005) ([www.flavornet.org](http://www.flavornet.org)). No entanto, durante o armazenamento dos sumos de laranja, o perfil aromático altera-se devido a diminuição ou aumento de alguns compostos e devido à formação de outros compostos que contribuem para um aroma atípico do sumo de laranja, sendo estes designados por *off flavours*. São conhecidos como *off flavours* no sumo de laranja, a partir de determinadas concentrações, os seguintes compostos:  **$\alpha$ -p-dimetilestireno** (cheiro a pinheiro, ou a citrino),  **$\beta$ -terpineol**, **terpineol-4** (cheiro a noz-moscada),  **$\alpha$ -terpineol**, **carvona**, **carveol**, **2,8-mentadiol**, **furfural** e **4-vinylguaiaicol** (Antunes, 2006) e (Berlinet *et al*, 2005). O  **$\alpha$ -terpineol** apresenta um cheiro floral ou a menta e para teores mais elevados é considerado como um *off flavour*, com cheiro a “terra molhada” ([www.flavornet.org](http://www.flavornet.org)).

A deterioração da qualidade do sumo de laranja resulta duma série complexa de reacções químicas e bioquímicas com diferentes velocidades de reacção que envolvem diferentes substratos, nomeadamente óleos essenciais, ácidos fenólicos, açúcares, lípidos, ácido ascórbico e compostos que contêm enxofre. Estudos já efectuados mostram que mais do que um tipo de mecanismo está envolvido no desenvolvimento de *off flavours*, podendo-se desenvolver através de actividade química, microbiológica ou enzimática. O **D-limoneno**, sofre uma série de reacções oxidativas de hidratação e desidratação, em meio ácido originando compostos, nomeadamente  **$\alpha$ -terpineol** e **cineol**. O **linalol**, também em meio ácido pode originar o  **$\alpha$ -terpineol**, **nerol** e **geraniol**. Na **figura 5** estão representadas estas duas hipóteses de formação do  **$\alpha$ -terpineol**. O  **$\alpha$ -pineno**, pode dar origem a compostos como o **terpineno-4-ol** e  **$\alpha$ -terpineol**.

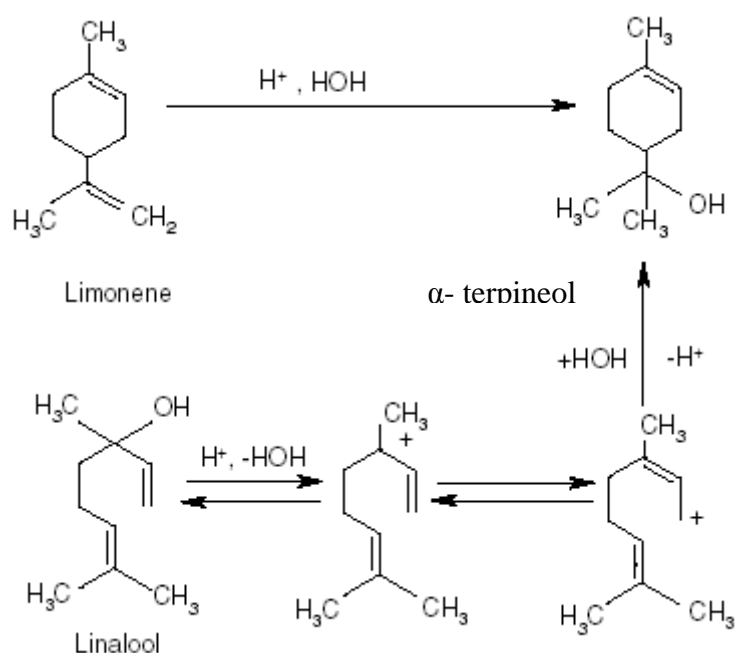


Figura 5 – Formação de α-terpineol através do linalol e do limoneno.

Fonte: António *et al*, 2005.

Devido ao carácter insaturado, o D-limoneno pode também produzir compostos como a **carvona** (cheiro a menta ou hortelã), o **carveol** (cheiro a hortelã), apresentados na **figura 6**, ou ainda compostos como o **2,8-mentadiol**, o **nerol** e o **geraniol** (cheiro a rosa) (Marcotte, 1998).

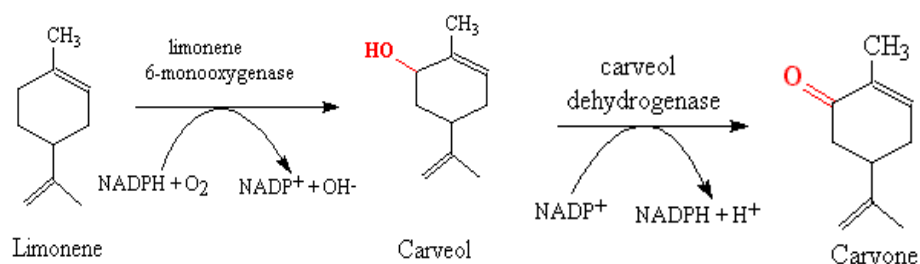
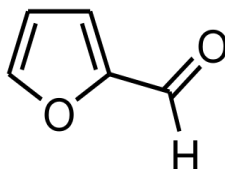


Figura 6 - Algumas reacções de biodegradação do limoneno

<http://umbbdd.msi.umn.edu/~servlets/pageservlet?ptype=r&reacID=r0714>

O **4-vinilguaiaacol** é considerado como o *off flavour* que mais contribui para a degradação do sumo de laranja e tem sabor a podre ou a fruta sobremadura. Estudos já efectuados demonstram que após 5 meses de armazenamento de sumos de laranja em PET a 22°C, este *off flavour* já é detectado por provadores (Berlinet *et al*, 2005).

Ainda a contribuir para os **off flavours** poderá ocorrer a formação de **furfural (figura 7)** resultante da oxidação de açúcares, que é caracterizado por ter um cheiro a amêndoa amarga e que confere uma cor acastanhada nos sumos.



**Figura 7** – Estrutura química do furfural

Só alguns dos compostos voláteis apresentam níveis para serem percebidos pelos seres humanos, mas cada substância aromática tem um limiar de detecção que, em igualdade de circunstâncias, depende da matriz do alimento (**Tabela 2**).

**Tabela 2 - Limiares de detecção olfactiva para alguns compostos em solução/emulsão aquosa**

Compostos	Limiares de detecção de odor (ppm)	Odores
Acetato de Etilo	5-5000	Ananás
Decanal	0,1 – 2	Casca de laranja
Citral	30	Limão
Furfural	3000 – 23000	Amêndoa
Geraniol	40-75	Rosa
4-vinylguaiacol	3	Podre
Butirato de hexilo	250	Banana
Limoneno	10	Citrinos, menta
Linalol	6	Floral, lavanda
Mirceno	13-15	Balsâmico, mosto de uva
Nerol	300	Doce
Nonanal	1	Citrino
$\alpha$ -pineno	6	Pinheiro
$\beta$ -pineno	140	Pinheiro, Resina
Butirato de propilo	18-124	Ananás
$\alpha$ -terpineol	330-350	Floral, bolor *

Terpinoleno	200	Doce, citrinos, pinheiro
Butirato de etilo	1	Ananás, sumo de laranja fresco, maçã

\*dependendo da concentração

<http://www.cschi.cz/odour/files/world/Thresholds%20table.pdf>, (Berlinet et al, 2005) e [www.flavornet.org](http://www.flavornet.org)

O refrigerante em estudo neste trabalho, o Bongo, é constituído por 8 frutos, limão, banana, laranja, alperce, maçã, ananás, maracujá e manga. Assim, para além dos compostos responsáveis pelo aroma típico a laranja, deverão estar presentes outros compostos responsáveis pelo aroma dos restantes frutos. Ou seja, poderão estar presentes compostos como o **hexanoato de etilo**, o **2-metilbutanoato** ou o **etil metilbutanoato**, principais responsáveis pelo aroma a maçã, ou ainda o **butirato de hexilo**, o **acetato de 2-pentanol**, e o **1-hexanol**, responsáveis pelo aroma a banana, ou o **acetato de hexilo**, responsável pelo aroma a alperce, ou o **p-menth-1-en-8-ol**, o **citronelal**, o **β-cubebeno**, o **cineole**, e o **neral** principais responsáveis pelo aroma a limão (Dixon et al, 2000), (Minh Tu et al, 2002) ([www.flavornet.org](http://www.flavornet.org)).

A contribuir para os *off flavours* poderá ocorrer a formação de **4-metilacetofenona** que tem um aroma do sumo de limão oxidado ou ainda a formação dos *off flavours* referidos anteriormente para o sumo de laranja (Berlinet et al, 2005) (Minh Tu et al, 2002).

## 5. Métodos analíticos para determinação do perfil aromático de sumos e refrigerantes

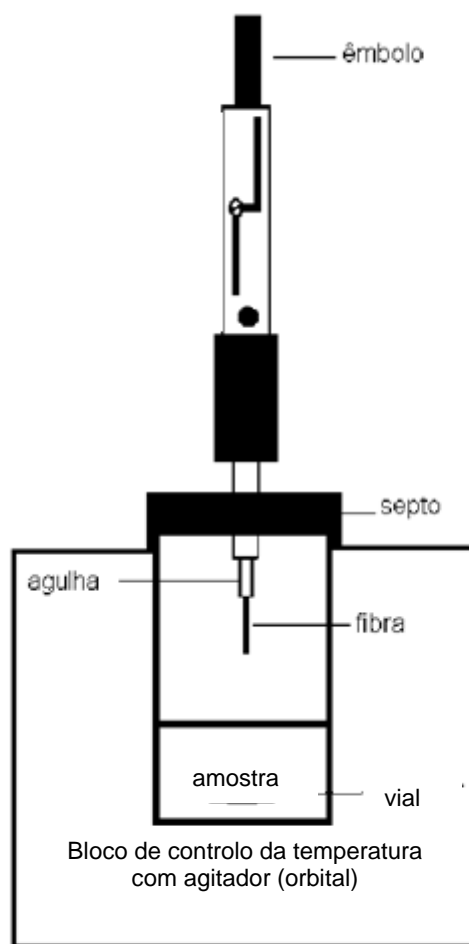
Os métodos analíticos para determinação do perfil aromático de amostras pressupõem a preparação de amostras, separação e detecção dos componentes a analisar. Entre os métodos de separação e detecção dos compostos voláteis mais utilizados encontra-se a **cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa** (GC-MS). A separação é obtida em função da maior afinidade dos componentes a separar pela fase móvel (gás) ou pela fase estacionária (interior de uma coluna cromatográfica com características de polaridade que podem ser diferentes). O método de preparação de amostras mais frequentemente utilizado para a análise de compostos voláteis é a **microextracção em fase sólida**.

---

## 5.1 Microextração em fase sólida (MEFS/SPME)

A microextração em fase sólida é uma técnica desenvolvida no início da década de 90 por Arthur e Pawliszyn. Neste procedimento é utilizada uma **fibra** de sílica fundida, recoberta com um filme de um polímero imobilizado (ex: polidimetilsiloxano ou poliacrilato) ou de um adsorvente sólido. Esta fibra está acondicionada dentro da agulha de uma microseringa. A extração pode ocorrer de duas maneiras:

1. **(DI)-SPME** - Mergulhando a fibra directamente na amostra (DI). Durante a extração a amostra é agitada e o tempo é controlado. Os analitos são concentrados durante um certo tempo (habitualmente entre 2-15 min). Após esta etapa a fibra é recolhida para dentro da agulha.
2. **(HS)-SPME** – Na técnica de *headspace* (HS) ou espaço de cabeça a fibra é exposta à fase de vapor que está em equilíbrio com a amostra líquida ou sólida, não entrando em contacto directo com a mesma, por isso a fibra pode ter um elevado tempo de utilização. Normalmente durante a extração a amostra é agitada e aquecida e os componentes voláteis são adsorvidos/absorvidos na fibra, conforme a **figura 8**. Após a extração os analitos presentes na fibra são dessorvidos termicamente pela sua introdução no injectador aquecido de um cromatógrafo gasoso (**Queiroz et al, 1999**).



**Figura 8 - Ilustração esquemática do método HS-SPME.**

As vantagens do método de microextração em fase sólida prendem-se com o facto de o procedimento analítico ser simples, rápido e não usar solventes orgânicos no processo de extração (Zambonin *et al*, 2003).

## **5.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)**

A utilização de um espectrómetro de massa como detector de cromatografia gasosa, foi desenvolvida durante a década de 50 por Roland Gohlke e Fred McLafferty. O cromatógrafo de fase gasosa utiliza uma coluna capilar (**fig. 9**) com diferentes dimensões (comprimento, diâmetro, espessura do filme) e com uma fase estacionária de diferentes características (por exemplo, 5% fenil metilpolisiloxano). As moléculas demoram tempos diferentes (o chamado tempo de retenção), para eluírem da coluna e no espectrómetro de massa são detectadas as moléculas previamente separadas. No espectrómetro de massa, a molécula é ionizada (na fonte de ionização) produzindo-se fragmentos que são detectados e que possuem diferentes valores de razão

massa/carga (m/z) ([http://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography-mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry)).

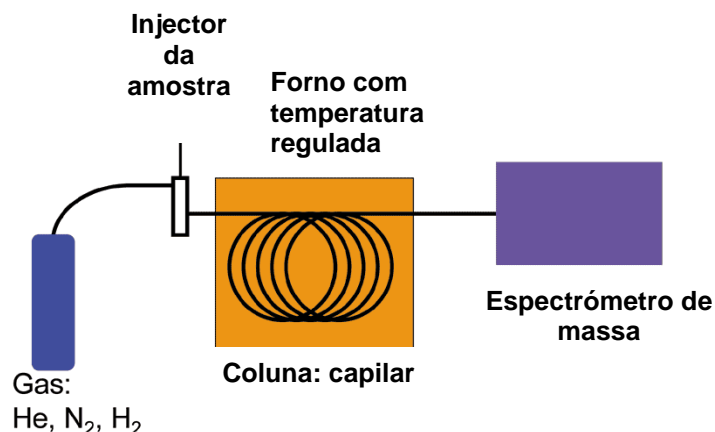


Figura 9 – Esquema de GC-MS

Fonte: adaptado de [http://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography-mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry)

Estas duas metodologias analíticas usadas em conjunto, permitem uma identificação mais fácil dos compostos presentes nas amostras em estudo, através dos 2 parâmetros característicos obtidos: tempo de retenção e espectro de massa (padrão de fragmentação). Por vezes duas moléculas diferentes podem ter um padrão de fragmentação semelhante no espectrómetro de massa, mas terão diferentes tempos de retenção na coluna, ou o contrário também pode acontecer.

A técnica de GC-MS tornou-se numa técnica muito importante na separação e identificação dos compostos responsáveis pelo *flavour* dos alimentos devido à possibilidade da separação de misturas complexas de componentes orgânicos que, de outra forma, seria muito difícil de efectuar (Berlinet *et al*, 2005). O registo de dados é sempre efectuado sob a forma de um cromatograma em que a área dos picos é directamente proporcional à concentração dos componentes na amostra. As bases de dados permitem fazer a identificação de um determinado composto por comparação do seu espectro de massa com uma vasta biblioteca de espectros de referência. O sucesso desta operação é indicado por um parâmetro, que é o índice de semelhança, que numa situação ideal atinge o valor máximo de 100%. Nunca se obtêm índices de semelhança de 100%, visto as condições de análise em que foram obtidos os espectros da biblioteca do software serem diferentes das condições de análise em que se está a trabalhar.



---

### 5.3 Análise de ácido ascórbico por HPLC

Um aparelho de HPLC é constituído por vários componentes como a bomba, injector, coluna, detector e sistema de aquisição e tratamento de dados.

Na cromatografia líquida de alta eficiência a separação é feita numa coluna. Os compostos são dissolvidos no solvente e forçados a passar por uma coluna cromatográfica sob pressão. A afinidade dos componentes da amostra a analisar para a fase móvel (solvente) e fase estacionária difere consoante os diferentes solventes e colunas escolhidas, sendo esta versatilidade do método uma das suas principais vantagens, permitindo a separação de inúmeros compostos químicos (**Lodder, A. 2005**). Após a injeção da amostra no injector a migração dos componentes da amostra, tal como na GC-MS, é realizada de acordo com a afinidade com a fase estacionária. A fase móvel a utilizar (eluente) deve possuir um elevado grau de pureza, ser compatível com o detector, deve solubilizar os componentes da amostra, ter baixa viscosidade e ser quimicamente inerte. As bombas de alta pressão são fundamentais para forçar o solvente e a amostra a atravessar a fase estacionária mantendo um fluxo constante através do sistema.

Na análise de ácido ascórbico foi utilizado um equipamento de HPLC constituído por uma coluna de fase reversa e com detector de vector de díodos e electroquímico.

---

## II Delineamento experimental

Como já foi referido, o presente trabalho teve como objectivo o estudo de variação do teor de compostos voláteis e ácido ascórbico em amostras de sumo e refrigerante em diferentes tipos de embalagem, ao longo do período de armazenamento. Em particular, para volumetria semelhante, compararam-se as embalagens PET (monocamada/multicamada) e cartão complexo (Tetrapak), uma vez que a técnica de enchimento é a mesma (enchimento asséptico, a temperatura ambiente). Dado que a temperatura é um factor determinante, o estudo foi conduzido a duas temperaturas diferentes: temperatura ambiente ( $\pm 22^{\circ}\text{C}$ ), para simular o envelhecimento dos produtos em prateleira de supermercado e, à temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  (envelhecimento acelerado). O aumento de temperatura nas amostras permitirá que determinadas reacções químicas que podem ocorrer naturalmente no sumo, ocorram a uma velocidade superior, permitindo assim obter tempos de amostragem mais curtos (uma semana) do que nos ensaios efectuados à temperatura ambiente. Foi ainda avaliado o efeito de congelação ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) na composição da amostra. O estudo desenvolveu-se em duas fases que consistiram na:

- 1. Optimização do método de análise por SPME-GC-MS**
- 2. Posterior análise de amostras de sumos e refrigerantes sujeitos a envelhecimento em condições controladas.**

Para a optimização do método utilizaram-se, para além do sumo de laranja e do refrigerante Bongo, sumo de maçã e refrigerante de limão para testar a versatilidade do método.

Relativamente aos ensaios por HPLC foram utilizadas condições de análise já anteriormente optimizadas no laboratório.

## II.1 Optimização de métodos analíticos

### 1.1 Amostras analisadas

Para a optimização de métodos, todas as amostras foram adquiridas numa superfície comercial. Amostras de sumos de laranja de uma embalagem Tetrapak de 1L de **Compal Fresh de Laranja** (sumo 100% à base de concentrado de laranja), lote L284978A1E. Amostras de sumo de maçã de uma embalagem Tetrapak de 1L de **Compal Fresh de Maçã** (sumo 100% à base de concentrado de maçã), lote L284988W1E. Amostras de **B!Limonada** (refrigerante de sumo de limão) em embalagem PET de 1,5L, lote L284796 J. Amostras **Bongo** (refrigerante de 8 sumos de fruta) em embalagem Tetrapak de 200ml , lote L296076W1A.

### 1.2 Preparação das amostras

Utilizaram-se apenas **dois** tipos de fibra, para a extracção dos compostos voláteis nomeadamente a PDMS e a DVB/CAR/PDMS, visto estas serem as mais adequadas para a microextracção em fase sólida de análises de *flavour* (Rega, 2003) (Yang, 1994) (Bicchi, 2000). Cada fibra tem características específicas apresentadas na **tabela 3**.

**Tabela 3 - Especificações das fibras utilizadas para a optimização de métodos**

<b>Fase estacionária</b>	<b>Espessura do filme</b>	<b>Comprimento da fibra</b>	<b>Descrição</b>
Polidimetilsiloxano (PDMS) Fibra vermelha	100µm	1 cm	Revestimento não ligado, estável com alguns solventes orgânicos miscíveis em água
Divinilbenzeno/Carboxeno/PDMS (DVB/CAR/PDMS) Fibra cinzenta	50/30µm	2cm	Revestimento ligado, isto é estável com todos os solventes orgânicos

Amostras de 7 mL de sumo (laranja, maçã ou limão) foram pipetadas para frascos de 20 mL que após devidamente fechados foram mantidos sob agitação a temperaturas

---

de 35°C e 40°C, expondo a fibra ao espaço de cabeça da amostra durante tempos de extracção diferentes (10, 20, 40 e 60 min). Os estudos foram conduzidos de forma a proceder à optimização de tempo de extracção e equilíbrio e temperatura de extracção.

Foi feito um estudo de repetibilidade das amostras, para verificar a precisão dos valores obtidos. Para o estudo de repetibilidade, foram feitas 6 repetições (n=6) de cada sumo/refrigerante para cada tipo de embalagem.

### **1.3 Equipamento e condições de análise**

**Identificação dos compostos voláteis por GC-MS:** os compostos voláteis foram analisados num equipamento de cromatografia gasosa, GC-2010 Gas Chromatograph Shimadzu, acoplado a um espectrómetro de massa, GCMS-QP2010, Gas Chromatograph Mass Spectrometer Shimadzu equipado com uma coluna capilar de sílica fundida, VF-5ms da Varian FactorFour (30,0m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura do filme), cuja fase estacionária é o (poli-(dimetilsiloxi)-poli-(1,4-bis-(dimetilsiloxi)-fenileno) siloxano). Foi utilizado o amostrador automático AOC 5000.

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros de massa dos compostos da biblioteca de espectros do software com os espectros de massa obtidos experimentalmente. As bibliotecas disponíveis no software são: WILEY 229, NIST 12, NIST 27 e NIST 147. A identificação de cada pico do cromatograma é feita com base numa lista de possíveis compostos com diferentes índices de semelhança (IS) por comparação do grau de semelhança do espectro de massa da biblioteca e o obtido durante a análise. São também usados valores de índices de retenção (IR) retirados da bibliografia ([www.flavornet.org](http://www.flavornet.org)).

## **2. Metodologias**

### **2.1 Desenvolvimento de metodologias analíticas**

Após a exposição da fibra de SPME ao espaço de cabeça da amostra, a fibra é transferida imediatamente para o injector do cromatógrafo para que ocorra a dessorção dos compostos, durante 3 min, a uma temperatura de 250°C.

Inicialmente o método de análise cromatográfico foi otimizado variando alguns parâmetros analíticos (**modo de injeção, rampa de temperatura**) e nas condições de preparação de amostra por microextração (tipo de fibra, temperatura, e tempo de extração)

#### 2.1.1. Variação das condições de análise no cromatógrafo de fase gasosa (GC)

Na **tabela 1** apresentam-se as condições relativas ao modo de injeção e temperaturas do forno do equipamento de GC-MS para as quatro experiências efectuadas.

**Tabela 4 - Gradientes de temperatura usados no forno do cromatógrafo e modo de injeção**

	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de patamar (min)	Tempo total (min)	Modo de injeção
<b>Experiência 1</b>	-	40	5	37	Splitless
	5	170	0		
	30	230	4		
<b>Experiência 2</b>	-	40	5	63	Splitless
	2,5	170	0		
	30	230	4		
<b>Experiência 3</b>	-	40	5	53	Splitless
	2	100	0		
	5	170	0		
	30	230	2		
<b>Experiência 4</b>	-	40	5	37	Split 1:10, 1:5, 1:3
	5	170	0		
	30	230	4		

**Na experiência 1** a temperatura inicial era de 40°C que se manteve durante 5 min, tempo após o qual aumentou para uma temperatura de 170°C com uma rampa de 5°C/min. Uma segunda rampa de temperatura (30°C/min) permitiu alcançar a temperatura de 230°C que se manteve durante 4 min. O tempo total do programa foi de 37 min.

**Na experiência 2** a temperatura inicial era de 40°C que se manteve durante 5 min, tempo após o qual aumentou para uma temperatura de 170°C com uma rampa de 2,5°C/min. Uma segunda rampa de temperatura a (30°C/min) permitiu alcançar a temperatura de 230°C, que se manteve durante 4 min, originando assim um tempo

total do programa de 63min, tempo este bastante superior ao da experiência 1, para a obtenção de uma melhor separação dos compostos.

**Na experiência 3** a temperatura inicial era de 40°C que se manteve durante 5 min, tempo após o qual aumentou para uma temperatura de 100°C com uma rampa de 2°C/min. Uma segunda rampa de temperatura a (5°C/min) permitiu alcançar a temperatura de 170°C. E por fim uma terceira rampa de temperatura a (30°C/min), permitiu alcançar a temperatura de 230°C que se manteve durante 2 min, originando assim um tempo total do programa de 53 min.

**Na experiência 4** utilizaram-se as mesmas rampas de temperatura da **experiência 1**, fazendo-se variar apenas o modo de injeção, que passou de splitless para split. Para tal, usaram-se três razões de split diferentes, **1:10, 1:5, e 1:3**.

### 2.1.2. Variação das condições de preparação de amostra por MEFS

Foram optimizadas as condições de preparação de amostra utilizando diferentes tempos e temperaturas de extracção, de acordo com o apresentado no tabela 5.

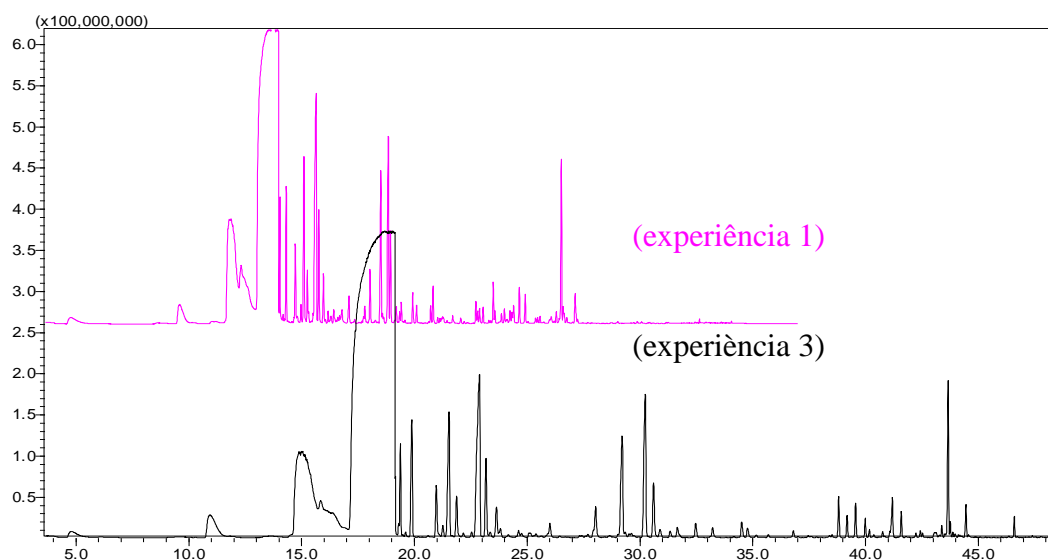
**Tabela 5 - Variação das condições de temperatura e tempo de análise cromatográfica e de extracção por MEFS**

	Condições de análise por GC-MS					Condições de extracção por MEFS	
	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de patamar (min)	Tempo total (min)	Modo de injeção	Temperatura de extracção (°C)	Tempos de extracção (min)
<b>Experiência 5</b>	-	40	5	37	Split 1:5	40	40
	5	170	0				
	30	230	4				
<b>Experiência 6</b>	-	40	5	37	Split 1:5	35/40	10
	5	170	0				
	30	230	4				
<b>Experiência 7</b>	-	40	5	37	Split 1:5	40	10/20/40/60
	5	170	0				
	30	230	4				

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Optimização das condições de análise cromatográfica

Analisaram-se amostras do refrigerante de limão (B! limonada) segundo nas condições das experiências 1, 2 e 3 e obtiveram-se os respectivos cromatogramas (ver *apêndice I*). Os cromatogramas mostram que os picos com tempos de retenção mais curtos são muito largos o que dificulta a análise desses compostos. Entre as 3 experiências, a experiência 2 parece ser a menos adequada visto detectar poucos compostos, e originar picos muito pequenos. Na **figura 10**, estão apresentados 2 cromatogramas referentes às amostras de sumo de laranja que foram analisadas nas condições descritas nas experiências 1 e 3 (de acordo com a **tabela 4**).



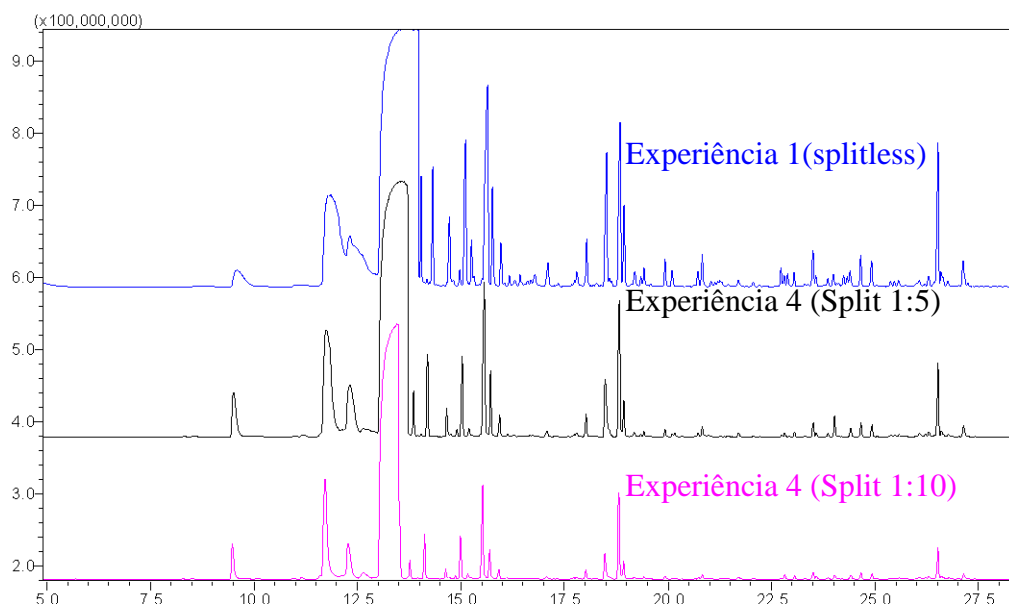
**Figura 10 - Comparação dos cromatogramas obtidos na análise de de amostras de Fresh Laranja em embalagem Tetrapak utilizando diferentes condições**

Os cromatogramas obtidos na análise do sumo de laranja mostram que as condições utilizadas na experiência 3 permitem uma melhor separação dos compostos, mas por outro lado os tempos de retenção são muito superiores e no início do cromatograma os picos com tempo de retenção mais curto são muito largos, pelo que este facto tem que ser optimizado.

Posteriormente foram analisadas amostras de sumo de maçã nas condições descritas na experiência 4 utilizando o modo de injeção de “split” e razões de split diferentes:

1:10, 1:5 e 1:3. Compararam-se os resultados obtidos com os obtidos na experiência 1, ou seja em modo de injeção de splitless (ver *apêndice I*)

Procedeu-se da mesma forma para o sumo Fresh laranja 100% (**fig. 11**), mas variando as condições de injeção.



**Figura 11 - Comparação dos três cromatogramas de amostras de sumo de laranja com duas razões de split: 1:5 e 1:10, e em modo splitless**

Os resultados obtidos nas experiências realizadas, mostram que para ambos os sumos, o modo de split, permite a obtenção de picos com forma mais adequada, mais estreitos. À medida que se diminui a razão do split, maiores são os picos e correspondentes áreas. Para a razão de 1:10, obtêm-se picos bem separados, no entanto constata-se uma diminuição de altura dos picos, e inclusive alguns picos de compostos deixam de ser detectados. Para a razão de 1:3 (analisada no sumo de maçã), apesar de os picos serem maiores a separação é pior, tornando a identificação dos compostos mais difícil. Como para análise dos compostos presentes nos sumos interessa ter picos bem separados, bem formados e capazes de serem detectados conclui-se que das experiências 1, 2, 3 e 4 realizadas conclui-se que o melhor método, consistiria na utilização de um split de razão de 1:5.

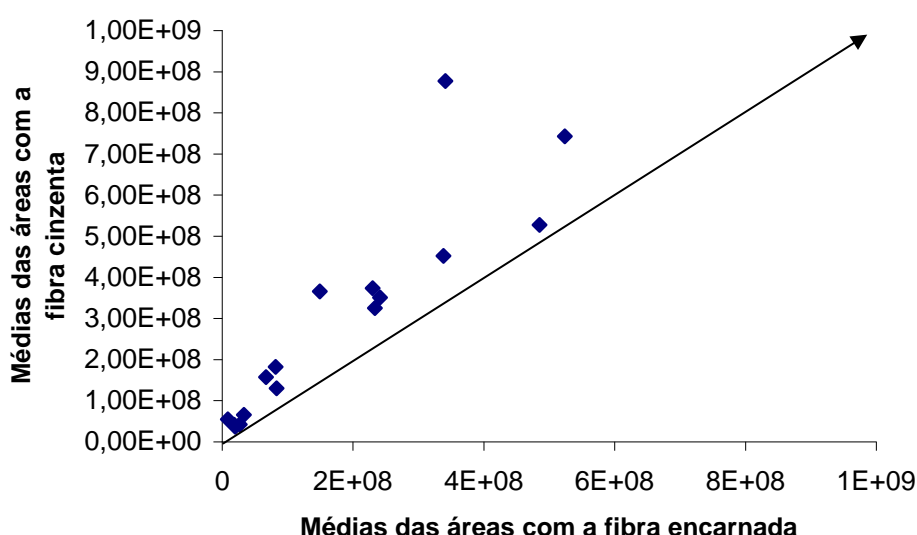
Para o refrigerante Bongo, o único estudo que foi feito consistiu em avaliar qual a melhor razão de split (ver *apêndice I*) e verificou-se que tal como para o sumo Fresh laranja 100%, as melhores condições corresponderiam a um split de razão de 1:5.



## 3.2 Optimiza  o das condi  es de prepara  o de amostra por MEFS

### 3.2.1 Escolha do tipo de fibra

Definidas as condi  es de análise cromatográfica, avaliou-se qual a fibra mais adequada para concentrar os compostos voláteis presentes na amostra. Compararam-se dois tipos de fibras, uma fibra de DVB/CAR/PDMS (fibra cinzenta), a qual foi utilizada nas análises anteriores e uma fibra de PDMS (fibra encarnada). Utilizou-se as mesmas condi  es experimentais para ambas (**experiência 5**). Analisaram-se 3 amostras de sumo Fresh laranja 100% em embalagem Tetrapak para cada tipo de fibra, num total de 6 amostras. Calculou-se a média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) das áreas originadas por cada uma das fibras, apresentadas em apêndice (*Apêndice I*) para cada composto responsável pelo *flavour* e possível *off flavour* e representou-se graficamente (**fig 12**).



**Figura 12 – Compara  o das áreas dos picos quando se utilizaram as fibras de DVB/CAR/PDMS (fibra cinzenta) e PDMS (fibra encarnada) para os principais compostos presentes no sumo de laranja.**

A figura 12 e a tabela apresentada no *Apêndice II* mostram que os compostos presentes no sumo Fresh laranja 100% apresentam uma maior afinidade    fibra cinzenta. Para   l  m disto, o desvio padrão relativo da área    menor quando se utilizou a fibra cinzenta (que variou dos 0,7 aos 4%) do que quando se utilizou a fibra encarnada (que variou dos 1,1 aos 14,3%). Sendo assim, concluiu-se que a **fibra cinzenta    a mais indicada para a análise dos compostos voláteis presentes em amostras de sumo Fresh laranja 100%.**

### 3.2.2 Optimização da temperatura de extracção

Analisaram-se amostras de sumo Fresh laranja 100% segundo as condições descritas na experiência 6 (**Tabela 5**), em que foram utilizadas duas temperaturas de extracção, 35°C e 40°C, respectivamente. Utilizaram-se apenas estas temperaturas, devido a estudos recentes indicarem que temperaturas superiores a 40°C na extracção, poderão levar ao aparecimento de novos compostos resultando numa alteração da amostra. Também não se experimentaram temperaturas inferiores, pois as condições devem ser o mais semelhantes possíveis às condições normais da ingestão de alimentos (**Antunes, 2006**). Fizeram-se 3 repetições da mesma amostra para cada temperatura. Mediu-se a área total nos picos detectados nos cromatogramas e obtiveram-se os resultados apresentados na **Tabela 6**.

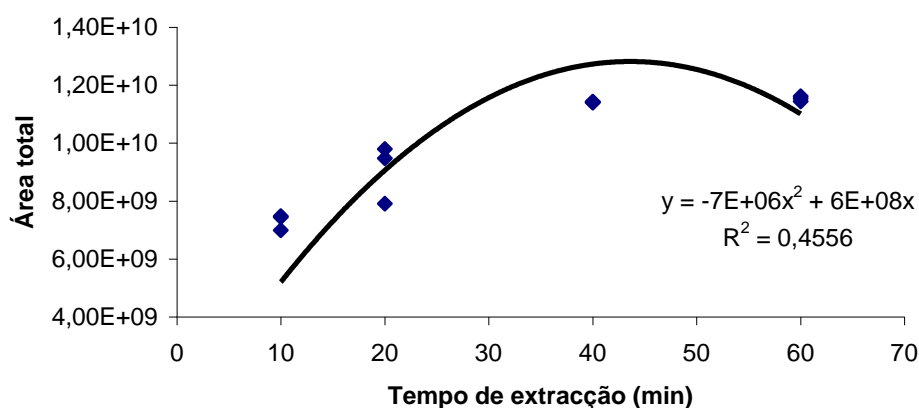
**Tabela 6 - Áreas totais, média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) das áreas obtidas após concentração das amostras a T= 35°C e 40°C**

Temperatura	Áreas totais	Média	DP	DPR (%)
35°C	9371998174	9070112951	306614632	3,4
	8758978216			
	9079362463			
40°C	8972675751	9269248182	431305182	4,7
	9764027911			
	9071040884			

As áreas dos picos são semelhantes para as duas temperaturas testadas. No entanto nota-se um aumento das áreas totais quando se passa dos 35°C para os 40°C, pelo que em termos gerais a **temperatura de 40°C no equilíbrio e na extracção** permite uma maior taxa de extracção de compostos.

### 3.2.3 Optimização dos tempos de extracção

Fizeram-se análises em triplicado para o sumo Fresh laranja 100% com 4 tempos de extracção diferentes, **10, 20, 40 e 60 min**, segundo a experiência 7. Mediram-se os valores das áreas totais dos picos detectados nos cromatogramas apresentados no Apêndice II e representaram-se graficamente (**figura 13**).



**Figura 13 - Evolução da área total dos picos detectados em função dos diferentes tempos de extração**

Verifica-se que à medida que se aumenta o tempo de extração, a área dos picos também sofre um aumento, mas dos 40 para os 60 min quase que não varia. Assim, decidiu-se que um **tempo de extração de 40 min** seria indicado para este tipo de sumo, nas condições ensaiadas.

#### 4. Escolha das condições de análise

Em resumo, os ensaios efectuados mostram que a preparação das amostras de sumo e de refrigerante deverão ser efectuada com a fibra DVB/CAR/PDMS, a uma temperatura de extração de 40°C, durante 40 min e que para o método de análise por cromatografia gasosa deverá ser usada o modo de injeção com “split” numa razão de 1:5 e com um tempo total de análise de 37 min (**Tabela 7**).

**Tabela 7 - Condições de análise a utilizar no estudo de envelhecimento de sumos e refrigerantes**

	Rampa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de patamar (min)	Tempo total (min)	Modo de injeção	Temperatura de extração (°C)	Tempos de extração (min)
<b>Método optimizado</b>	-	40	5	37	Split 1:5	40	40
	5	170	0				
	30	230	4				

Antes de se procederem aos estudos das amostras sujeitas a condições de envelhecimento, foram feitos estudos de repetibilidade para ambas as amostras de sumo Fresh laranja 100% e de refrigerante Bongo em cada tipo de embalagem. Verificou-se que os resultados das áreas totais expressos em DPR variaram entre 1,2 - 3,27% e ainda que as áreas médias dos principais compostos presentes no sumo Fresh laranja 100% variaram entre os 2 – 14,8% pelo que se considera que o método é repetível (ver *Apêndice III*). Para este estudo poderá considerar-se como critério de repetibilidade uma variação máxima de 5% para as áreas totais e 15% para as áreas individuais.

## II.2 Estudo do envelhecimento de sumos e refrigerantes

Amostras das diferentes bebidas em estudo foram recolhidas na fábrica e logo após produção, sujeitas a condições de envelhecimento acelerado a 40°C e mantidas à temperatura ambiente a aproximadamente 22°C. Após abertura das embalagens foram retiradas amostras que foram congeladas a -20°C e posteriormente foram analisadas nas condições anteriormente descritas.

### 2.1 Amostras analisadas

Para o estudo referente ao sumo Fresh laranja 100%, foram analisadas amostras de embalagens PET monocamada de 1,5L e de embalagens Tetrapak de 1L, ambas de Fresh 100% laranja. Para o estudo do refrigerante Bongo 8 frutos, as amostras estavam acondicionadas em embalagens PET multicamada de 250 mL e embalagens Tetrapak de 200 mL.

As amostras foram ensaiadas em triplicados (n= 3) para cada tempo de envelhecimento e para cada uma das embalagens. Os ensaios de envelhecimento ocorreram durante o período de tempo e nas condições descritas na **Tabela 8**. A periodicidade da amostragem é apresentada na tabela 8.

**Tabela 8 - Periodicidade do envelhecimento do sumo Fresh laranja 100% e do refrigerante Bongo**

Bebidas	Dias de Envelhecimento acelerado	Dias à temperatura ambiente
Sumo de Laranja	1, 3, 7, 10, 14	30, 60
Refrigerante Bongo	1, 3, 7, 12, 14	15, 30

---

Para avaliar a possibilidade de se congelarem amostras e se proceder em seguida à análise das amostras todas juntas procedeu-se a um breve estudo do efeito de congelação das amostras na sua composição volátil.

Para este estudo de congelação, foram preparadas 6 amostras (n=6) de cada sumo para cada tempo de envelhecimento das embalagens PET e congelaram-se. As amostras de **sumo Fresh laranja 100%** e de **refrigerante Bongo** foram descongeladas nos tempos apresentados na **Tabela 9**.

**Tabela 9 - Periodicidade da congelação**

<b>Bebidas</b>	<b>Dias de Congelação</b>
<b>Sumo de Laranja</b>	1, 5, 11
<b>Refrigerante Bongo</b>	4, 14

## **2.2. Análise dos compostos voláteis**

### **2.2.1. Preparação das amostras**

Amostras de 7 mL de sumo Fresh laranja 100% e refrigerante Bongo foram pipetadas para frascos de 20 mL que após devidamente fechados foram mantidos sob agitação e à temperatura de 40°C, expondo a fibra ao espaço de cabeça da amostra durante um tempo de extracção de 40 min. A fibra utilizada foi a DVB/CAR/PDMS.

### **2.2.2. Equipamento e condições de análise**

O equipamento foi idêntico ao que se utilizou para a optimização do método. As condições de análise estabelecidas foram as condições acima descritas na **tabela 7**.

## **2.3 Análise do teor de vitamina C**

### **2.3.1 Preparação das amostras**

Na análise do refrigerante Bongo e do sumo Fresh laranja 100%, foram preparados duplicados (n=2) para cada tempo de envelhecimento: pipetaram-se 100 µl de cada sumo das diferentes embalagens sujeitas a envelhecimento para cada “vial” e juntaram-se 900 µl de solvente, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ácido fosfórico) a 2%, obtendo-se assim uma diluição de 1:10. Procedeu-se a uma centrifugação a 5000 rpm durante 10 min antes da análise cromatográfica.

---

### **2.3.2 Equipamento e condições de análise**

Os compostos foram analisados num equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de díodos acoplado a um detector electroquímico (HPLC/DAD/ED). Este, é equipado com uma coluna RP-18, Lichrocart (250 x 4,5), Merck, uma pré-coluna RP-18, Lichrosper, 5  $\mu$ m, uma bomba, um amostrador automático e um detector da ThermoFinnigan. O sistema de aquisição de dados utilizado foi o ChromQuest 4.1.

O eluente utilizado preparado por diluição de 50 mL de ácido acético glacial em 1000 mL de água destilada.

### **2.4 Tratamento estatístico dos resultados**

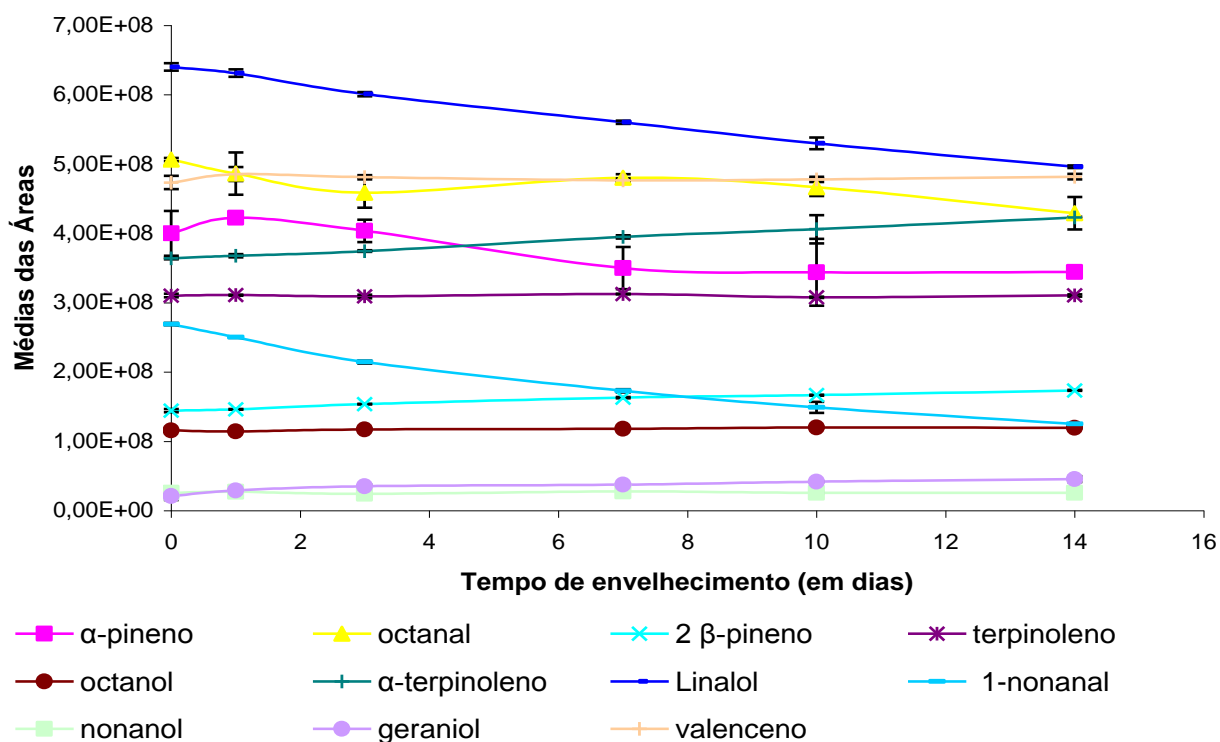
O software utilizado para a análise estatística dos resultados foi o Statistica V.6.0 da Statsoft. Recorreu-se ao teste de diferença mínima significativa (LSD) de Fisher para um nível de confiança de 95%, a fim de se verificar a existência de variações significativas nas médias das áreas dos compostos de cada sumo para os estudos de envelhecimento do perfil aromático. Não se procederam a mais análises estatísticas, visto para os restantes estudos o número de amostras ser demasiado pequeno (n=2).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Análise de compostos voláteis no Sumo Fresh laranja 100%

##### 3.1.1 Envelhecimento acelerado à temperatura de 40°C para amostras em embalagem PET e Tetrapak

Calcularam-se as áreas médias, o valor de DP, e o valor de DPR, para os principais compostos do sumo Fresh laranja 100%, apresentados no *Apêndice IV*. De referir que não foi possível calcular a variação do limoneno, pois o pico deste composto saturou em todas as amostras analisadas, o que era previsível dado o elevado teor deste composto nas bebidas analisadas. Representaram-se graficamente as variações ao longo do tempo dos principais compostos responsáveis pelo **flavour** (figuras 14 e 16), e dos compostos associados aos **off-flavours** do respectivo sumo (figura 17).

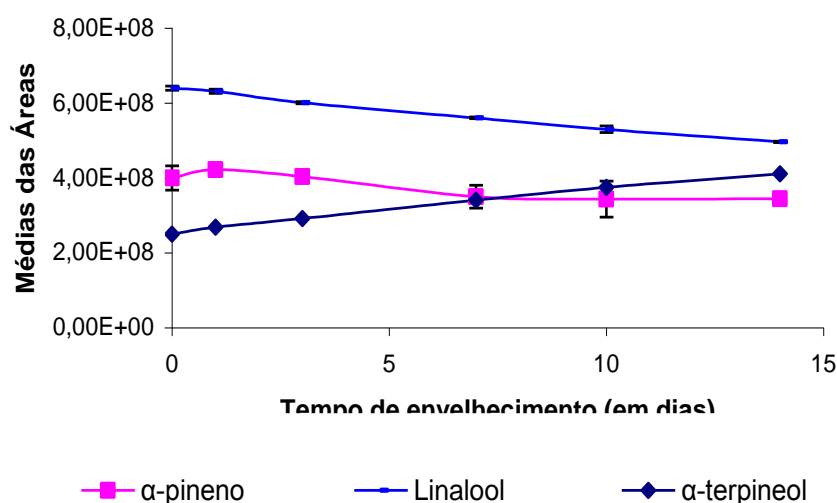


**Figura 14 - Variação das áreas médias dos compostos responsáveis por *flavour* em função do tempo de envelhecimento em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão)**

As maiores diferenças observadas na concentração dos compostos, foram: no **nonanal**, no  **$\alpha$ -terpineol**, no  **$\alpha$ -pineno**, no  **$\alpha$ -terpinoleno**, no **octanal**, no **linalol**, no **2- $\beta$ -pineno**, no  **$\beta$ -terpineol**, no  **$\alpha$ -*p*-dimetilestireno** e no **geraniol**. Os restantes compostos, nomeadamente, **terpinoleno**, **octanol**, **nonanol**, **valenceno** e dois

compostos que podem ser associados a **off-flavours** (fig 17), **4-terpineol** e **carvona** permaneceram praticamente nas mesmas concentrações com zero dias de envelhecimento e no fim aos 14 dias de envelhecimento forçado, não havendo diferenças significativas nas concentrações destes compostos ao fim dos 14 dias ( $p < 0,05$ ) (apêndice V).

Três compostos que são associados a **off flavours** (fig 17),  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -terpineol, e  $\alpha$ -*p*-dimetilestireno sofreram um aumento acentuado na área do pico o que corresponderá a um aumento da concentração na amostra. Durante o envelhecimento forçado (14 dias) o  $\alpha$ -terpineol, sofreu um aumento de 64% da sua concentração inicial, o  $\beta$ -terpineol 85% e o  $\alpha$ -*p*-dimetilestireno 100%. Pela análise da tabela apresentada no apêndice V, estes aumentos são significativos, logo a partir do 1º dia para o  $\alpha$ -terpineol e o  $\alpha$ -*p*-dimetilestireno, e a partir do 3º dia para o  $\beta$ -terpineol. O aumento do  $\alpha$ -terpineol, poderá ser explicado pela redução da concentração dos compostos responsáveis pela formação deste *off flavour*, nomeadamente, o **limoneno**, o  $\alpha$ -pineno e o linalol (figura 15)



**Figura 15 – Evolução do  $\alpha$ -terpineol em função das variações do  $\alpha$ -pineno e do linalol, em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão)**

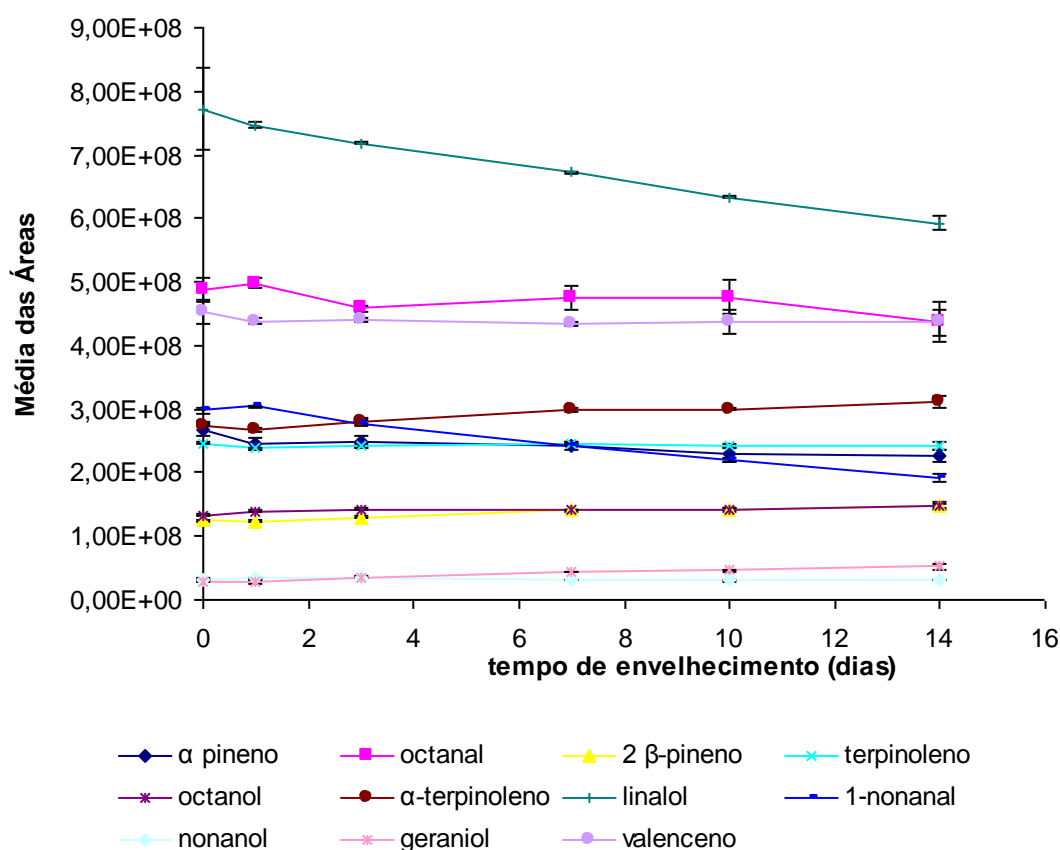
O **2- $\beta$ -pineno**, **geraniol**, e o  $\alpha$ -terpinoleno, sofreram um aumento na sua concentração ao fim dos 14 dias do envelhecimento forçado, de 20%, 116%, 16% respectivamente. Mais uma vez estes aumentos são significativos, logo a partir do 1º dia para o caso do geraniol e  $\alpha$ -terpinoleno, e a partir do 3º dia para o **2- $\beta$ -pineno**.



Uma vez que o linalol, sob condições ácidas forma geraniol, o aumento da concentração do geraniol pode ser explicada pela redução da concentração do linalol.

Os restantes compostos responsáveis por *flavours*, ao fim dos 14 dias, relativamente à sua concentração inicial, sofreram uma diminuição, nomeadamente, o **1-nonanal** em 54%, sendo significativa a sua diminuição logo após o 1º dia de envelhecimento, o **α-pineno** em 14%, sendo significativa apenas a partir do 7º dia, o **octanal** em 15%, sendo significativa a partir do 3º dia e por fim o **linalol** em 23%, sendo significativa a partir do 1º dia.

Na **figura 16** apresenta-se o gráfico ilustrativo das variações das áreas dos compostos responsáveis pelo *flavour* no sumo Fresh laranja 100% em embalagem Tetrapak.



**Figura 16 – Variação das áreas médias dos compostos responsáveis por *flavour* em função do tempo de envelhecimento em embalagem Tetrapak (±desvio padrão)**

---

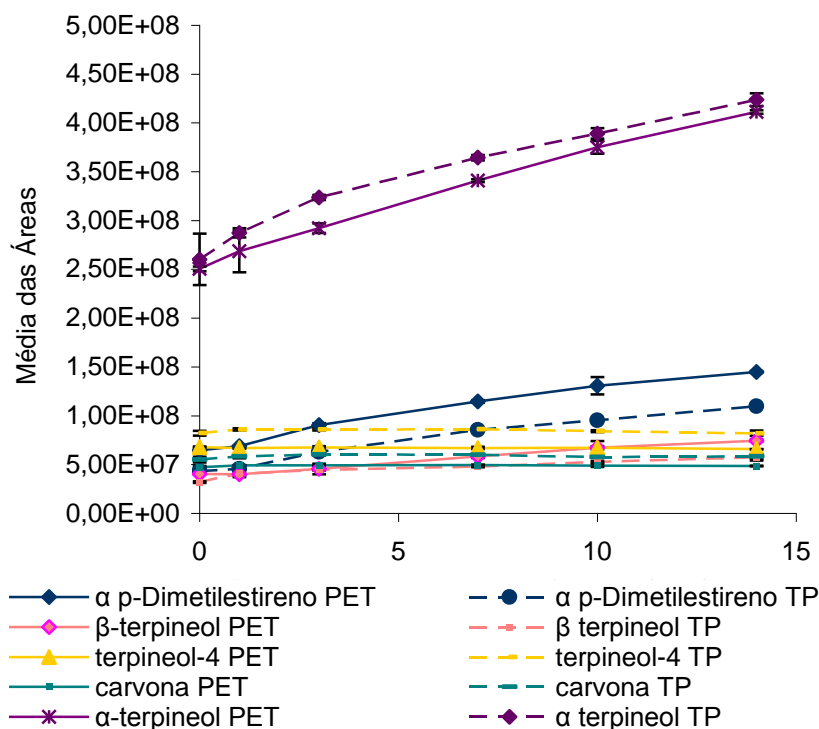
Os compostos que sofreram maior alteração ao longo dos 14 dias do processo de envelhecimento acelerado foram:  **$\alpha$ -pineno**,  **$\alpha$ -*p*-dimetilestireno**, **linalol**,  **$\alpha$ -terpineol**, **1-nonanal**, **2- $\beta$ -pineno**, **geraniol**,  **$\beta$ -terpineol**,  **$\alpha$ -terpinoleno** e **octanal**.

O linalol, o 1-nonanal e o octanal sofreram um decréscimo na sua concentração. Ao fim de 14 dias de envelhecimento o **linanol** decresceu 23,2%, o **1-nonanal** decresceu 36%, e por fim o **octanal** decresceu 10,4% das suas concentrações iniciais. A diminuição do linalol, foi significativa a partir do 7º dia, já as diminuições do nonanal e octanal, foram significativas a partir do 3º dia de envelhecimento (*apêndice V*).

Os restantes compostos, ao fim de 14 dias de envelhecimento, sofreram um aumento na sua concentração nomeadamente: o **2- $\beta$ -pineno** 19,4%, o **geraniol** 83%, o  **$\alpha$ -terpinoleno** 13%, e por fim os possíveis *off flavours*  **$\beta$ -terpineol** 78,8%, o  **$\alpha$ -*p*-dimetilestireno** 154,4% e o  **$\alpha$ -terpineol** 62% das suas concentrações iniciais (**fig 16**). Os aumentos das concentrações destes 3 possíveis *off-flavours*, foram significativos logo após o 1º dia de envelhecimento. Os 3 compostos, nomeadamente o **2- $\beta$ -pineno**, o **geraniol**, o  **$\alpha$ -terpinoleno**, só ao fim do 3º dia de envelhecimento é que as suas variações foram significativas.

Estudos anteriores resultantes de avaliação sensorial de sumos de laranja em embalagem Tetrapak (**Antunes, 2006**), revelaram a existência de diferenças significativas entre sumos de laranja logo após um dia de envelhecimento em estufa a 40°C. Assim, considero que as alterações observadas no presente estudo poderão dar origem a alterações organolépticas.

Na **figura 17** ilustra-se a evolução de possíveis *off flavours* ao longo do tempo de envelhecimento de cada embalagem respectivamente (**PET e Tetrapak**)

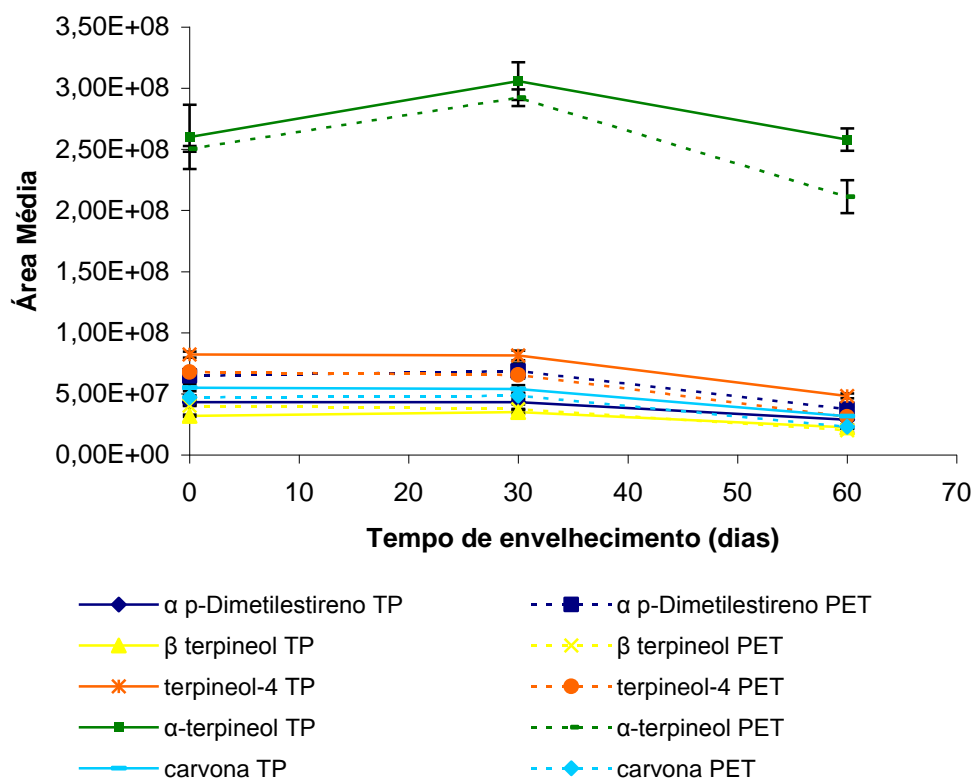


**Figura 17 - Evolução e comparação de possíveis *off flavours* nos sumos de laranja embalados em PET e Tetrapak ( $\pm$ desvio padrão)**

Atendendo à **figura 17** e aos *apêndices IV e V*, as variações sofridas nas diferentes embalagens têm a mesma tendência/evolução. Assim, considera-se que ao fim de 14 dias de envelhecimento forçado, no que diz respeito ao perfil aromático as amostras em diferentes embalagens apresentaram um comportamento semelhante.

### 3.1.2 Envelhecimento à temperatura ambiente para amostras em embalagem PET e Tetrapak

Os sumos de laranja das duas embalagens estudadas, sofreram um decréscimo em todos os ***off flavours*** avaliados ao fim dos 60 dias de envelhecimento (**fig 18**). No entanto, alguns ***off flavours***, aumentaram a sua concentração até aos 30 dias, decrescendo aos 60 dias, acabando assim com uma concentração final inferior à inicial.



**Figura 18 – Variação das áreas médias dos compostos responsáveis pelos possíveis *off-flavours* no sumo de laranja em PET e Tetrapak ao longo do tempo de envelhecimento natural ( $\pm$ desvio padrão)**

Para o caso dos *flavours* (fig. 19 e fig 20), em ambas as embalagens, tal como no caso dos *off flavours*, todos os compostos sofreram um decréscimo na sua concentração ao fim dos 60 dias. O decréscimo foi maior dos 30 para os 60 dias para todos os compostos e para ambas as embalagens.

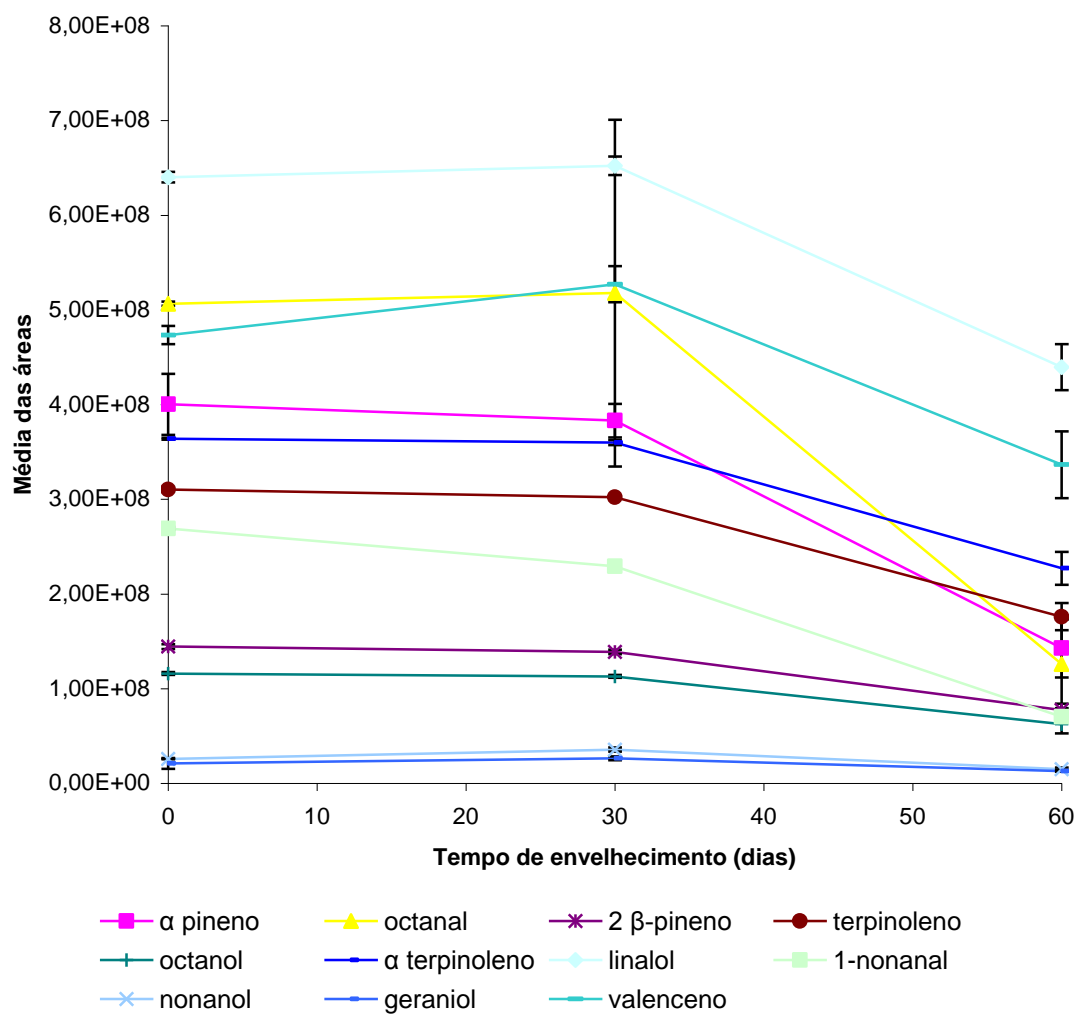
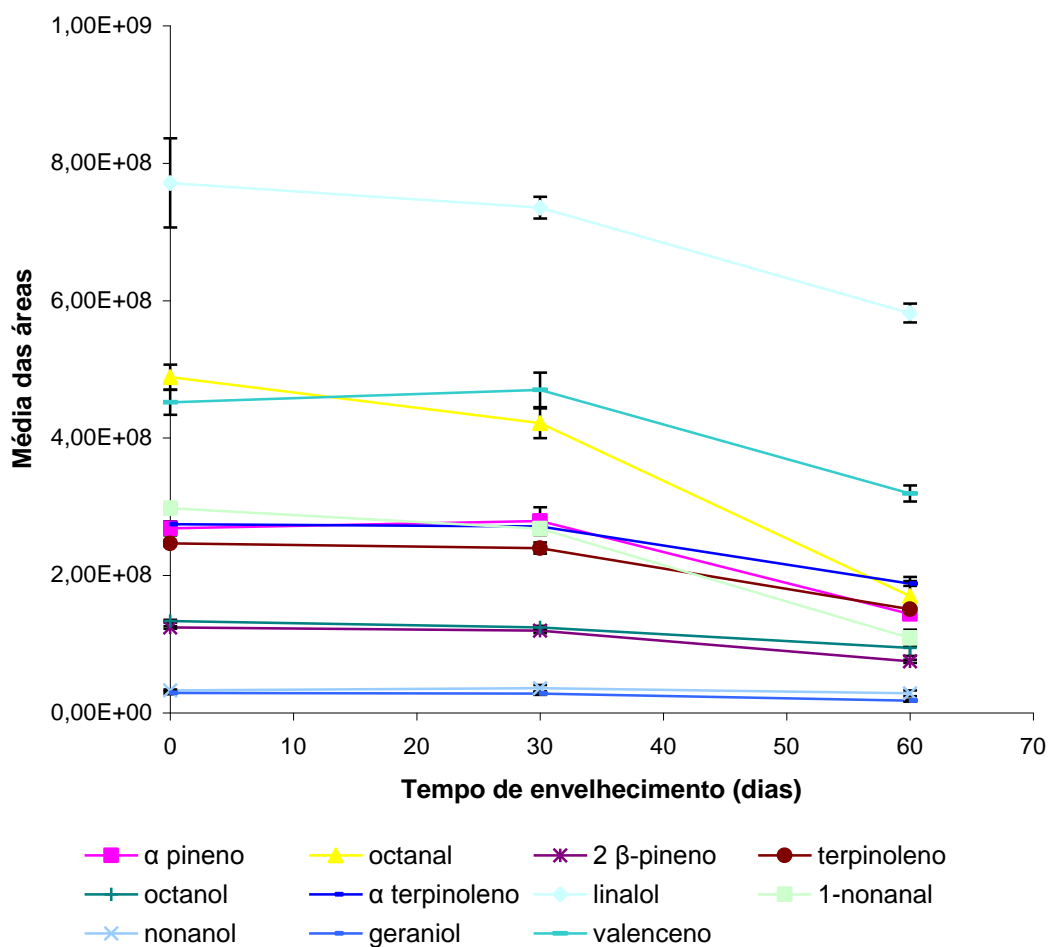


Figura 19 - Variação dos compostos de *flavour* presentes nos sumos de laranja em PET ao longo do tempo de envelhecimento natural ( $\pm$ desvio padrão)

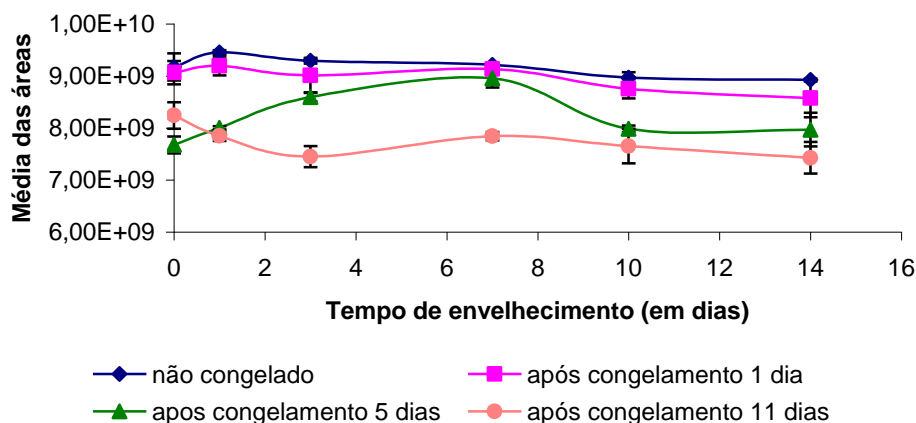


**Figura 20 - Variação das áreas médias dos compostos responsáveis por *flavours* no sumo de laranja em Tetrapak ao longo do tempo de envelhecimento natural.**

A tabela apresentada no *apêndice IV* mostra que apesar de o comportamento ser semelhante para os dois tipos de embalagem, nota-se que o decréscimo das concentrações dos compostos é sempre maior na embalagem PET do que na embalagem Tetrapak. Em relação ao tratamento estatístico, notaram-se algumas variações significativas para ambas as embalagens (*apêndice V*). Na embalagem PET, 5 compostos ao fim dos 30 dias mostraram diferenças significativas (**1-nonanal, β-terpineol, nonanol, α-terpineol, e valenceno**), já na embalagem Tetrapak apenas 4 compostos mostraram variações significativas (**1-nonanal, β-terpineol, α-terpineol e octanal**). Assim, é possível afirmar que num período de 60 dias, a embalagem que sofre **menores variações** nas concentrações iniciais dos compostos é a embalagem **Tetrapak**. No entanto um maior período de amostragem seria necessário para confirmar estas tendências que podem ter ocorrido somente devido a alterações no desempenho da fibra usada, daí o interesse em se proceder ao estudo do efeito da congelação da amostra.

### 3.1.3 Estabilidade da amostra após congelação

Em apêndice encontram-se os cálculos do desvio padrão, desvio padrão relativo e a média das áreas totais para cada tempo de congelação (apêndice VII). Representaram-se graficamente os resultados apresentados na **figura 21**.



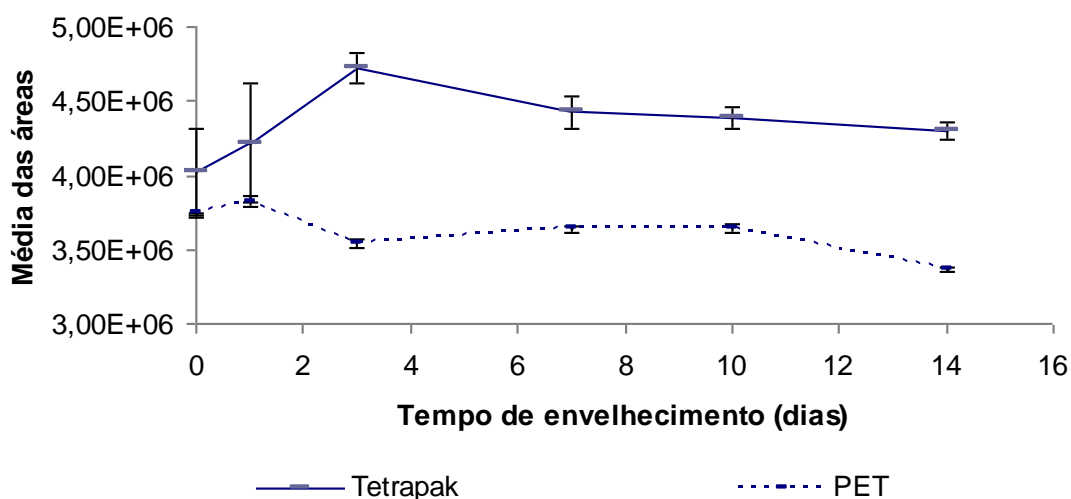
**Figura 21 – Áreas médias totais em função do tempo de congelação ( ± desvio padrão)**

Pelos valores observados no gráfico, podemos verificar que à medida que o tempo de congelação das amostras aumenta, a área total dos respectivos compostos diminui. Ao fim das amostras estarem congeladas durante 1 dia, a área média total diminui em 4%. Já no caso das amostras congeladas durante um período de 5 dias, há variações que chegam a ser na ordem dos 16%, e no caso das amostras congeladas durante 11 dias chega a haver variações na ordem dos 19%. Assim, verifica-se que há uma tendência para a perda dos compostos voláteis, com o aumento da exposição aos tempos de congelação.

### 3.2 Análise de ácido ascórbico no sumo Fresh laranja 100%, à temperatura de 40°C

Atendendo aos dados apresentados no *apêndice VIII* e na figura 22, para a embalagem em Tetrapak, o teor de ácido ascórbico, cresceu até aos 3 dias de envelhecimento, notando-se depois um decréscimo, até aos 14 dias de envelhecimento, nunca chegando a ter uma concentração inferior ao tempo zero. Normalmente, seria de esperar, que ao longo do tempo de envelhecimento, o teor em ácido ascórbico decrescesse. A explicação que parece mais plausível para estes

resultados prende-se com o facto das amostras utilizadas nos tempos 0,1,3,7,10 e 14, serem todas provenientes de diferentes embalagens, podendo diferir o teor de ácido ascórbico nas mesmas. Para além disso pode-se verificar que o desvio padrão para os primeiros tempos de envelhecimento (0 e 1 dia) é elevado, comprovando a discrepância entre as amostras. Assumindo que o valor de ácido ascórbico inicial corresponde ao valor máximo observado, (tempo 3 dias) conclui-se que aos 14 dias, o teor de **ácido ascórbico** nos sumos armazenados em **Tetrapak**, sofreu um **decréscimo de 9%** na sua concentração.



**Figura 22 - Evolução de ácido ascórbico ao longo do tempo de envelhecimento em PET e Tetrapak**

Nas amostras acondicionadas em embalagem de **PET**, a concentração de ácido ascórbico também sofre um aumento até ao primeiro dia de envelhecimento, no entanto este aumento é muito pequeno e ao fim dos 14 dias a variação foi cerca de **10% menor**.

Com as semelhanças observadas no comportamento do ácido ascórbico em PET e Tetrapak, considera-se que o **efeito da embalagem não é relevante no ensaio de envelhecimento acelerado**.



### 3.3 Análise de compostos voláteis no refrigerante Bongo

#### 3.3.1 Envelhecimento acelerado à temperatura de 40°C para amostras em embalagem PET e Tetrapak

Nas figuras 23 e 24, representou-se graficamente a variação da área dos principais compostos que contribuem para o *flavour*, detectados na análise do refrigerante Bongo acondicionado em embalagem PET.

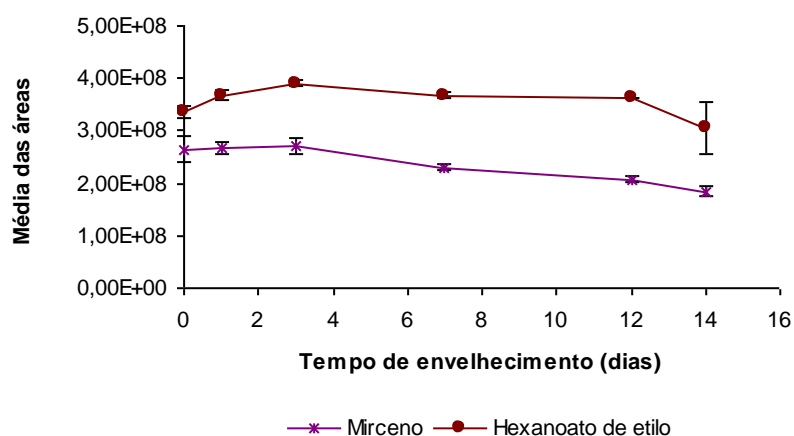
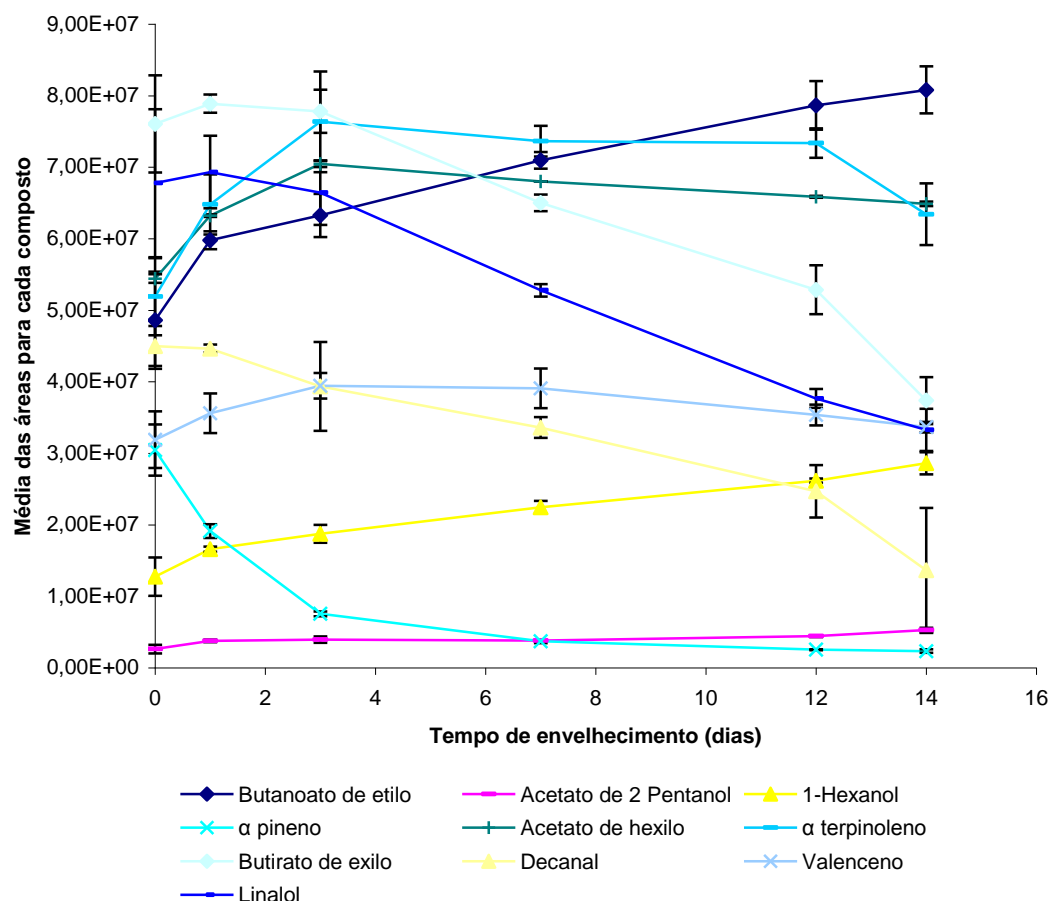


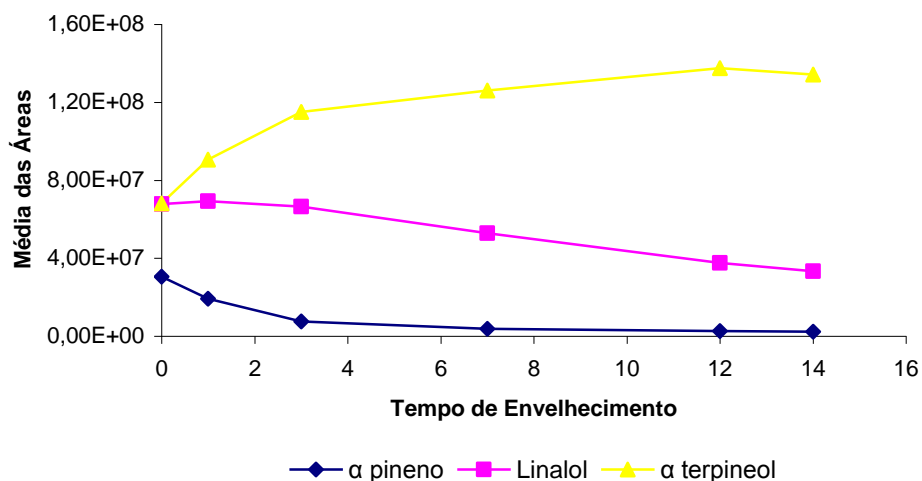
Figura 23 - Variação das áreas médias de alguns compostos responsáveis por *flavours* do refrigerante Bongo em função do tempo de envelhecimento em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão)



**Figura 24 - Variação das áreas médias de alguns compostos responsáveis por *flavours* do refrigerante Bongo em função do tempo de envelhecimento em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão)**

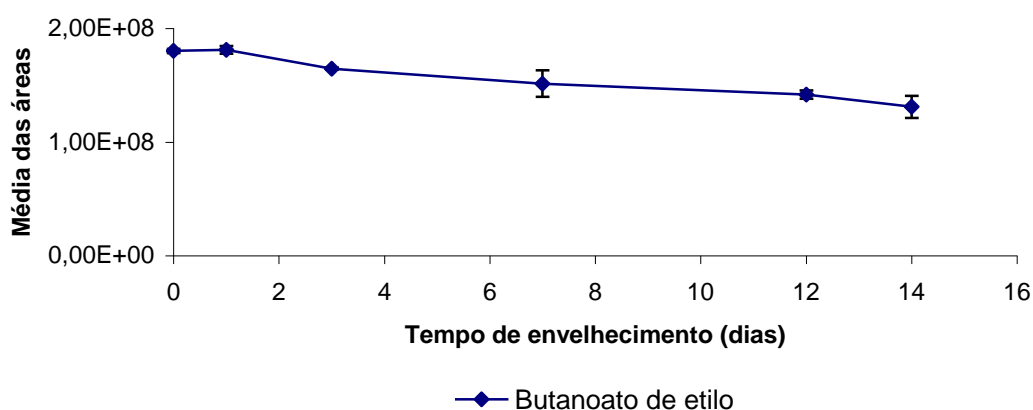
As **figuras 23 e 24**, bem como a tabela no *apêndice IX* mostram que ao fim dos 14 dias de envelhecimento acelerado alguns compostos sofreram um acréscimo relativamente à sua concentração inicial, sendo que este acréscimo mostrou ser significativo a partir do 1º dia para todos, nomeadamente o **1-hexanol**, o **acetato de 2-pentanol**, **butanoato de etilo**, o **α terpinoleno** e o **acetato de hexilo** respectivamente 124%, 100%, 66%, 22% e 19%. Outros compostos sofreram um decréscimo, também significativo, mas só a partir do 7º dia, nomeadamente o **decanal**, o **butirato de exilo**, o **linalol**, o **mirceno** e o **α pineno**, respectivamente 70%, 51%, 51%, 30%, e 92%) e **outros aumentaram o seu teor** até um determinado tempo de envelhecimento e depois decresceram (**hexanoato de etilo** e o **valenceno**), não sendo significativo ao fim dos 14 dias (*apêndice VI*). O hexanoato de etilo, principal responsável pelo aroma a maçã, foi o composto presente em maior concentração ao longo de todos os dias de envelhecimento no refrigerante.

A diminuição tanto do  **$\alpha$ -pineno** como do **linalol**, pode ser devida à formação do  **$\alpha$ -terpineol**, visto se ter verificado um aumento de 97% em relação à sua concentração inicial (**figura 25**), sendo este aumento significativo logo a partir do 1º dia.



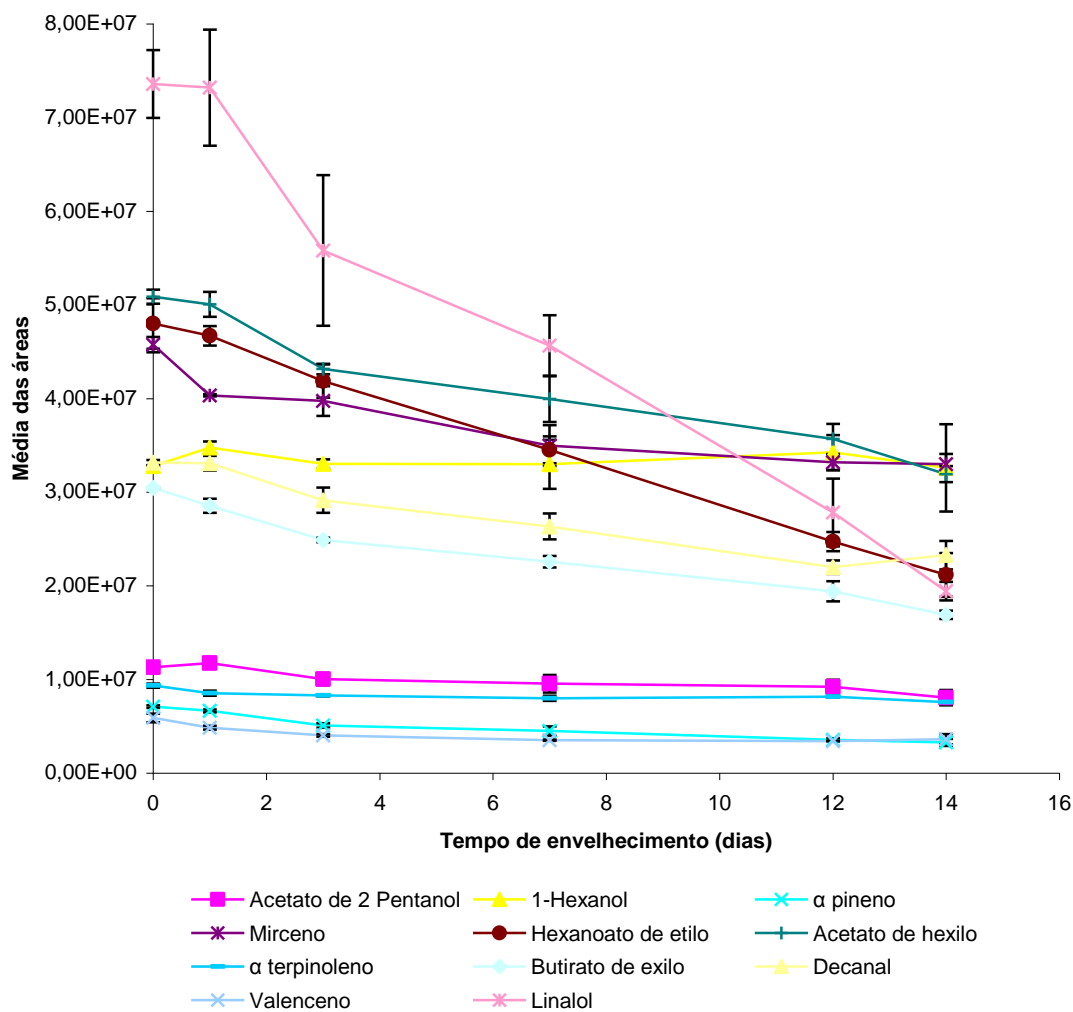
**Figura 25 – Evolução do  $\alpha$ -pineno, linalol em função das variações do do  $\alpha$ -terpineol, em embalagem PET ( $\pm$ desvio padrão)**

Representaram-se graficamente as médias das áreas obtidas para cada tempo de envelhecimento para os compostos principais presentes nos cromatogramas referentes à análise do refrigerante Bongo em Tetrapak (**fig. 26 e 27**).



**Figura 26 - Variação das áreas médias do butanoato de etilo em função do tempo de envelhecimento em embalagem Tetrapak**

Entre os compostos detectados e analisados, o composto presente em maior quantidade no refrigerante bongo em embalagem tetrapak foi o **butanoato de etilo**, responsável pelo aroma a ananás (**figura 26**).

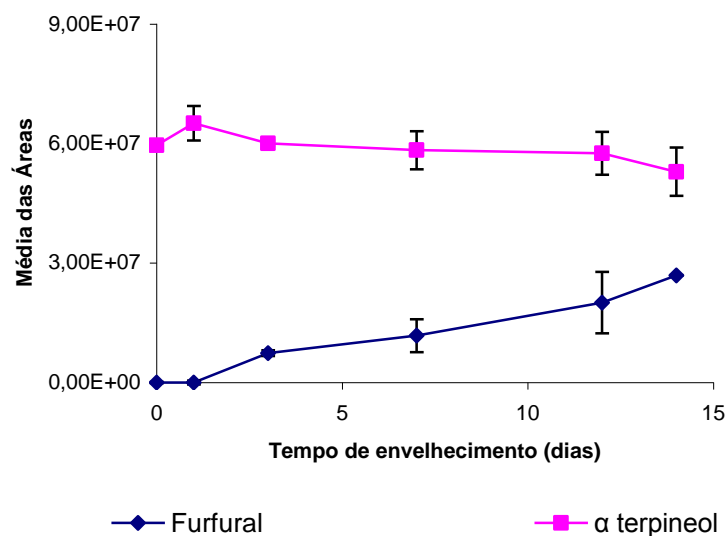


**Figura 27 - Variação das áreas médias de alguns compostos responsáveis por *flavour* no refrigerante bongo em função do tempo de envelhecimento em embalagem Tetrapak**

A maioria dos compostos presentes no refrigerante bongo em embalagem Tetrapak sofreu um decréscimo na sua concentração (*apêndice IX*). O composto cujo teor decresceu mais foi o **linalol**, diminuição de 74%, e que foi significativa a partir do 3º dia de envelhecimento. Dos restantes compostos ilustrados na **figura 27**, o **valenceno** e o **1-hexanol** não sofreram quaisquer variações significativas. Já o **mirceno**, o  **$\alpha$ -terpinoleno**, e o **butirato de hexilo** sofreram variações significativas, logo no 1º dia. Nos restantes (**butanoato de etilo**,  **$\alpha$ -pineno**, **acetato de hexilo**, **decanal**, **acetato de 2 pentanol** e **hexanoato de etilo**), as variações só foram significativas a partir do 3º dia.

A partir dos 3 dias a 40°C, detecta-se a presença de **furfural** (**figura 28**). Este *off flavour*, no tempo de envelhecimento zero não era detectado, acabando por aparecer ao 3º dia e atingir ao 14º dia uma área de quase 4 vezes superior à inicial. No entanto

este composto, tem um limiar de detecção de odor elevadíssimo (**tabela 2**) para os seres humanos, sendo que dificilmente seria detectada a sua presença.



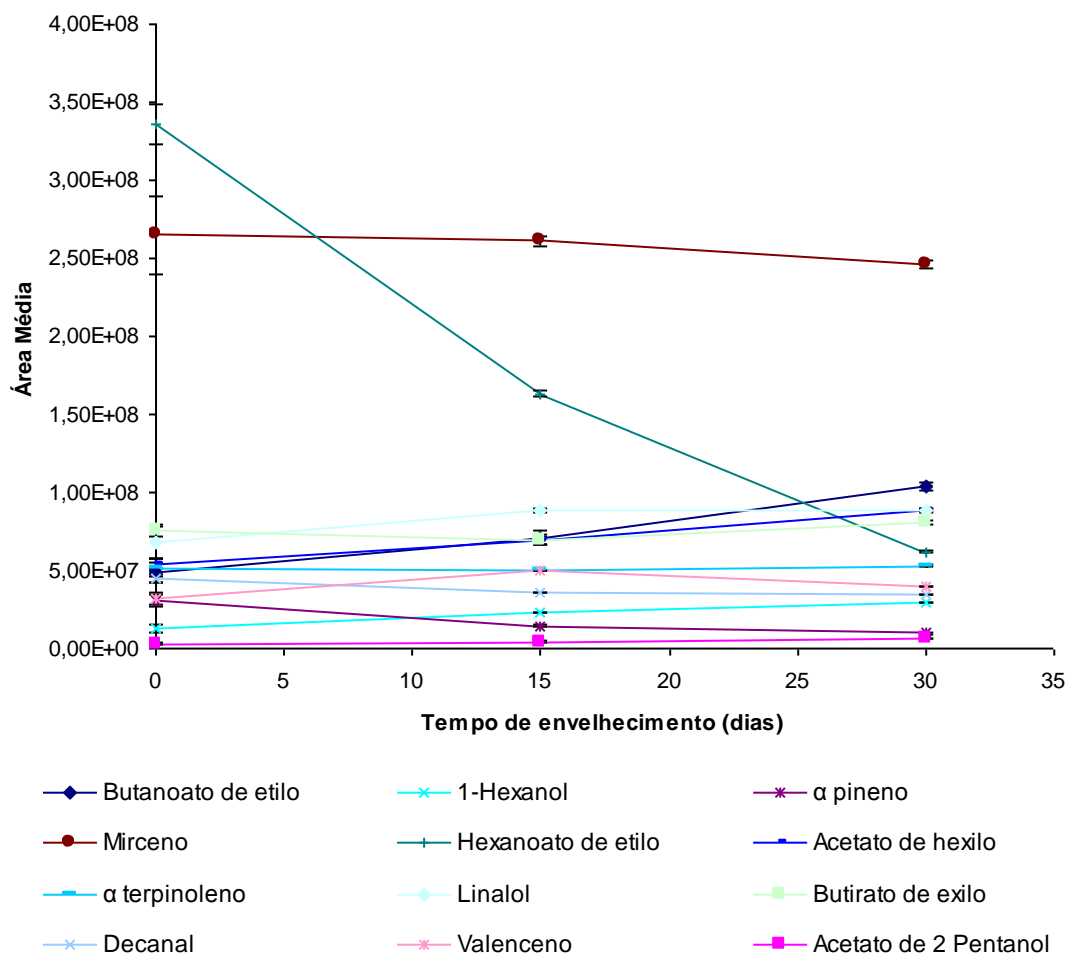
**Figura 28 – Evolução de possíveis *off flavours* presentes no refrigerante Bongo em embalagem TP.**

Outro composto eventualmente responsável pelo aparecimento de *off flavour*, o **α-terpineol**, aumentou a sua concentração do tempo zero para o tempo um, no entanto decresceu em 12% relativamente à sua concentração inicial, não sendo considerada uma variação significativa (*apêndice VI*).

Tendo em conta as variações observadas em cada composto para ambas as embalagens (na tabela apresentada no *apêndice IX*), e a análise estatística (*apêndice VI*), verifica-se que as amostras acondicionadas em embalagem Tetrapak sofreram menos alterações ao longo do tempo de envelhecimento acelerado.

### 3.3.2 Envelhecimento à temperatura ambiente para amostras em embalagem PET e Tetrapak

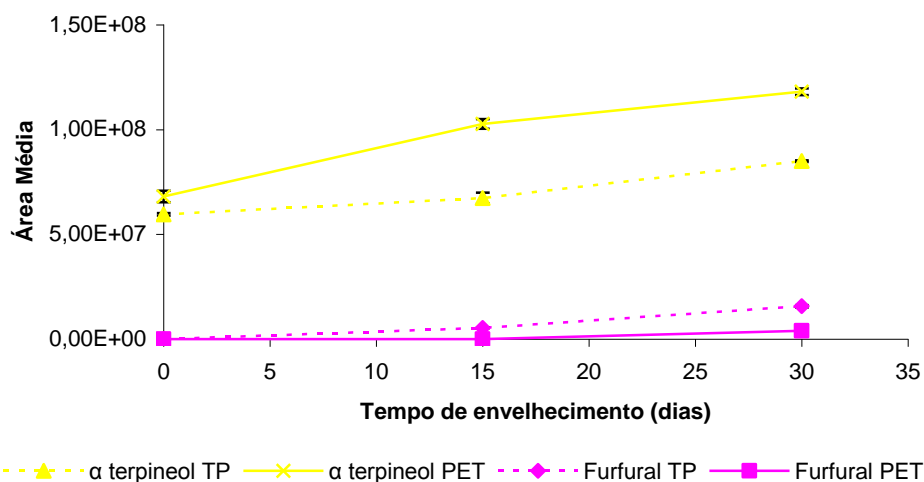
Ao fim dos 30 dias à temperatura ambiente, alguns compostos detectados nas amostras em embalagem PET aumentaram e outros diminuíram a sua concentração, tal como é apresentado na **figura 29**.



**Figura 29 – Variação dos principais compostos presentes no Bongo envelhecidos à temperatura ambiente em embalagem PET**

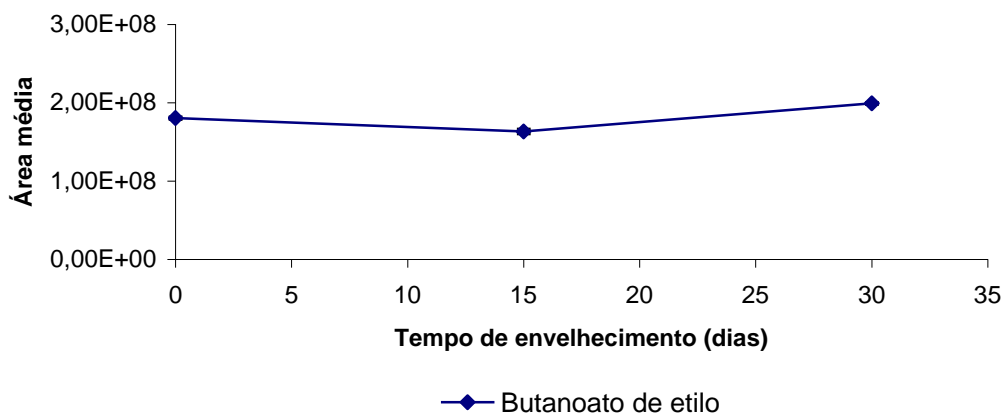
O composto que sofreu o maior decréscimo foi o **hexanoato de etilo** (presente em maior quantidade no início), com um decréscimo de 81%, seguindo-se o **α-pineno**, 68%, depois o **valenceno**, 25% e por fim o **mirceno**, 7%. Todos estes compostos excepto o mirceno, demonstraram ter variações significativas logo após os 15 dias de envelhecimento à temperatura ambiente (*apêndice VI*). Alguns compostos aumentaram o seu teor, nomeadamente, o **butanoato de etilo**, com diferenças significativas após os 15 dias, o **acetato de 2-pentanol** e o **1-hexanol**, ambos com diferenças significativas após os 30 dias. Ao fim dos 30 dias foi detectada a presença do **furfural** (**figura 30**). O **α-terpineol** sofreu um aumento na sua concentração inicial, em 73% (estatisticamente significativo logo após 15 dias). Outros compostos, como o **acetato de hexilo**, o **linalol**, o **valenceno**, o **butirato de hexilo** e o **α-terpinoleno** aumentaram, respectivamente, em: 64%, 31%, 25%, 6% e 1%. O acetato de hexilo, o linalol, e o valenceno, mostraram diferenças significativas após os 15 dias, o butirato

de hexilo mostrou só ao fim de 30 dias, e por último, o  $\alpha$ -terpinoleno não mostrou diferenças significativas ao longo dos 30 dias à temperatura ambiente. O composto presente em maior quantidade no fim do período de envelhecimento nas amostras acondicionadas em PET foi o **mirceno**, caracterizado por ter um aroma balsâmico.

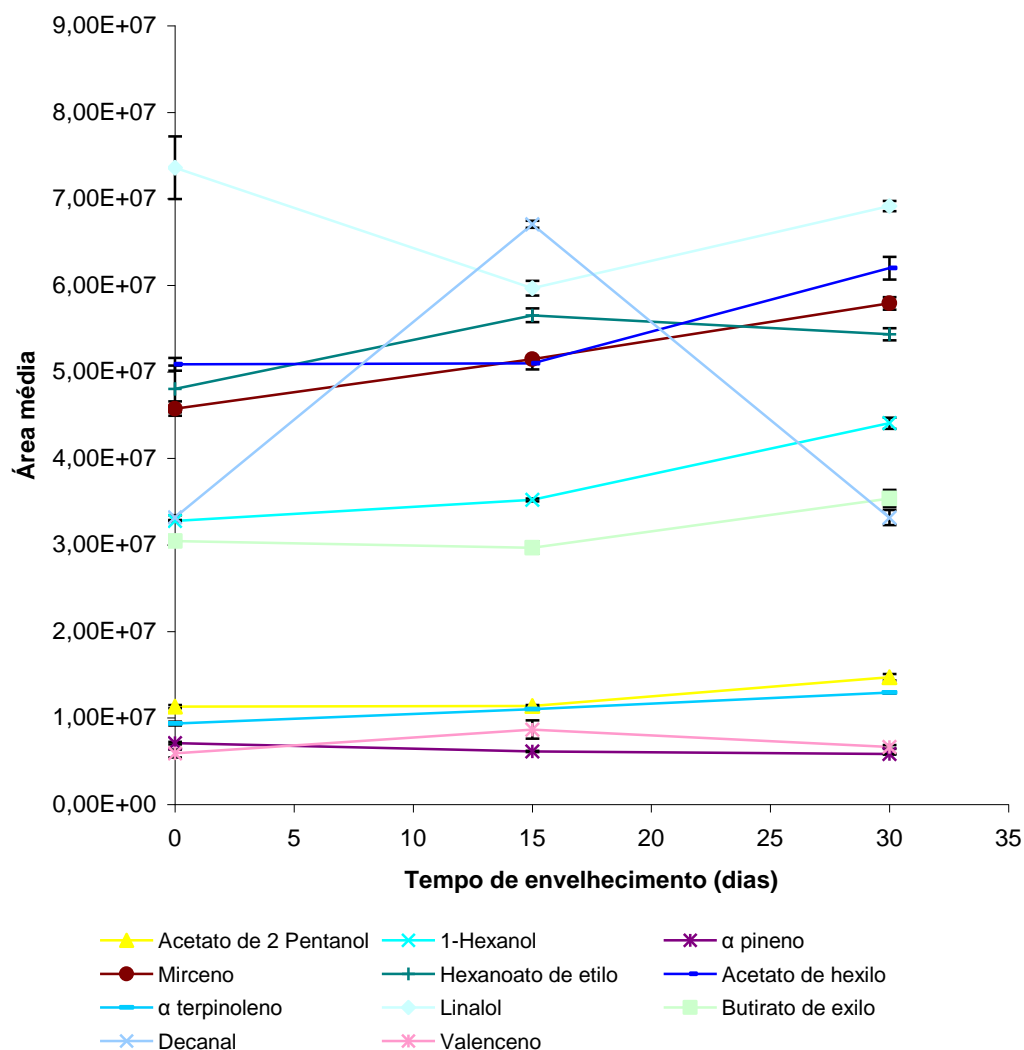


**Figura 30 - Evolução de possíveis off flavours presentes no refrigerante Bongo envelhecido temperatura ambiente em embalagem PET e Tetrapak**

Tal como aconteceu nas embalagens PET, formou-se **furfural**, no entanto neste caso detectou-se logo aos 15 dias e a sua concentração no final dos 30 dias era maior do que na embalagem PET. Dos restantes compostos a aumentar a sua concentração, o **α-terpineol** foi o composto que mais aumentou, subindo **43%**, sendo esta variação significativa após os 15 dias. O **butanoato de etilo**, tal como no envelhecimento a 40°C foi o composto presente em maior quantidade (**fig. 31**).



**Figura 31 – Evolução do butanoato de etilo presente no refrigerante Bongo envelhecido à temperatura ambiente em embalagem TP**



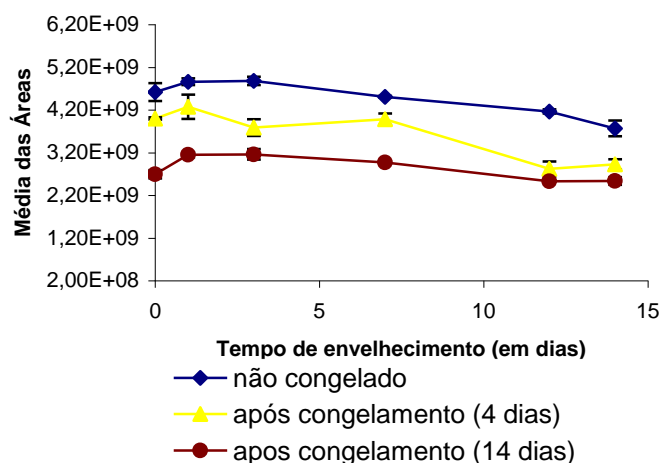
**Figura 32 - Variação dos principais compostos presentes no Bongo envelhecidos em embalagem Tetrapak à temperatura ambiente**

Nas amostras provenientes de embalagens Tetrapak, **alguns** compostos **aumentaram** a sua concentração, **outros decresceram** ou mantiveram-se **iguais** à concentração inicial (fig 32). O **α-terpinoleno**, o **mirceno**, o **butirato de hexilo**, o **hexanoato de etilo**, o **valenceno** e o **butanoato de etilo** cresceram respectivamente, 38%, 26%, 16%, 13%, 13%, 10%, resultando em variações significativas após 15 dias à temperatura ambiente. Outros compostos que também aumentaram, mas só tiveram variações significativas ao fim dos 30 dias foram o **1-hexanol** o **acetato de 2-pentanol** e o **acetato de hexilo**, respectivamente 34%, 30% e 21%. Os compostos cujo teor diminuiu foram o **α-pineno**, 18%, e o **linalol**, 6%, ambas significativas após os 15 dias.



Os resultados mostram que para a temperatura ambiente, as amostras que sofreram maiores alterações ao longo dos 30 dias de envelhecimento foram as amostras acondicionadas nas embalagens PET (*apêndice IX*). No entanto houve uma maior formação de um *off flavour*, o **furfural**, na amostra em embalagem Tetrapak. De qualquer forma, devido às grandes alterações em PET, a melhor escolha da embalagem para o Bongo, em termos da melhor preservação das características do produto, para um período de 30 dias à temperatura ambiente, será a embalagem **Tetrapak**.

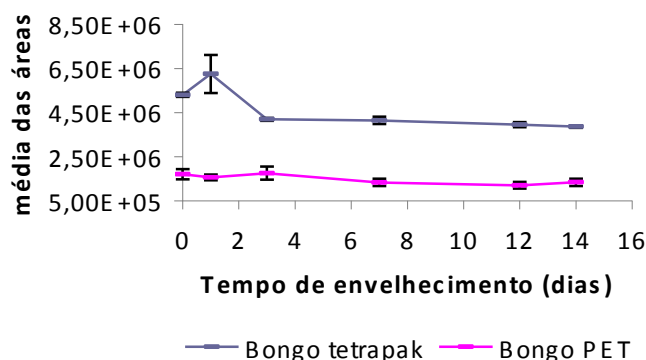
### 3.3.3 Estudo de composição volátil das amostras após congelação



**Figura 33 – Efeito do congelamento no Bongo**

A **figura 33** e a tabela em *apêndice X*, mostram que se verifica que nas amostras com 4 dias de congelação ocorrem variações nos compostos voláteis, na ordem dos 12 a 32%. Ao fim de 14 dias sofrem variações na ordem dos 32 a 41%. Tal como para as amostras de sumo Fresh laranja 100%, com o aumento do tempo de congelação, parece haver uma tendência para a diminuição dos compostos voláteis presentes nas amostras.

### 3.4 Análise de ácido ascórbico no refrigerante Bongo à temperatura de 40°C em embalagem PET e Tetrapak



**Figura 34 – Comparação da variação de ácido ascórbico no Bongo, ao longo do tempo de envelhecimento nas duas embalagens PET e Tetrapak.**

De acordo com a **figura 34** é notória a diferença do teor inicial em ácido ascórbico em cada embalagem, sendo superior na embalagem Tetrapak do que na embalagem PET.

Em **ambas as embalagens**, verificou-se um **decréscimo** das áreas do ácido ascórbico, ou seja um decréscimo da sua concentração inicial. No caso da embalagem Tetrapak, o decréscimo foi mais acentuado, tendo a sua concentração diminuído em 27%, ao fim dos 14 dias. No entanto, o período no qual o refrigerante perdeu mais ácido ascórbico foi do tempo 1 dia para o tempo 3 dias. Já no caso da embalagem PET, o decréscimo foi gradual, acabando o refrigerante por ficar ao fim dos 14 dias com menos 21,6% da sua concentração inicial.

---

### III Conclusões

O presente estudo permitiu concluir que:

- O método de preparação de amostras por SPME mostrou ser adequado para a análise da componente aromática de sumos e refrigerantes. Os ensaios efectuados, mostraram que a preparação deverá ser efectuada com a fibra DVB/CAR/PDMS, a uma temperatura de extracção de 40°C, durante 40 min.
- A análise cromatográfica por GC-MS permitiu detectar e identificar compostos característicos destas amostras e que há interesse em monitorizar durante o processo de envelhecimento por contribuir para as características sensoriais destes produtos.
- Quando se conservam as amostras congeladas, os resultados mostram que os compostos voláteis presentes no sumo Fresh laranja 100% e no refrigerante Bongo diminuem as suas concentrações ao longo do tempo, tendo-se detectado reduções na ordem dos 19% ao fim de 11 dias e na ordem dos 41% ao fim de 14 dias, respectivamente.

Relativamente aos estudos de envelhecimento,

- Para o **sumo Fresh laranja 100%**, à temperatura de 40°C, as alterações no perfil aromático e no teor de ácido ascórbico foram muito semelhantes para ambas PET e Tetrapak, pelo que não se constatou a influência do efeito de embalagem. À temperatura ambiente, verificou-se que nos dois tipos de embalagens todos os compostos decresceram. No entanto, em termos gerais há mais variações significativas na embalagem PET do que em Tetrapak. Pelo que se pode afirmar que a embalagem que confere maior protecção à variação da vitamina C e perfil aromático é a embalagem Tetrapak.
- Para o **refrigerante Bongo** à temperatura de 40°C, as amostras de cada uma das embalagens sofreram um aumento de um composto diferente que poderá ser considerado um *off flavour*. Neste caso, o comportamento das duas embalagens divergiu. A embalagem Tetrapak confere maior protecção no que diz respeito ao perfil aromático em condições de envelhecimento acelerado. O

---

teor de ácido ascórbico, decresceu em ambas as embalagens, no entanto o decréscimo foi mais acentuado na Tetrapak, sendo que a mais eficiente foi a PET multicamada. À temperatura ambiente, registaram-se mais alterações em PET, sendo que a melhor escolha para estas condições será a embalagem Tetrapak. Assim, no que diz respeito ao perfil aromático, a embalagem Tetrapak parece ser uma escolha acertada. No entanto, para o caso do teor em ácido ascórbico, a embalagem PET multicamada parece ser a mais indicada.

- Mais estudos de envelhecimento à temperatura ambiente deverão ser efectuados, considerando um tempo de amostragem maior.

---

## IV Referências Bibliográficas

**Amaral, J. D.** (1994). *Os citrinos*. Nova colecção, Técnica Agrária 9, Clássica Editora, Porto.

**Antonio J., Saura D., Lorente, J., Angel, A.** (2005). *Limonene, linalool,  $\alpha$ -terpineol, and terpinen-4-ol as quality control parameters in mandarin juice processing*. Eur Food Res Technol. Pp 281-285. Múrcia, Spain.

**Antunes, C.S.** (2006) *Sumos de Fruta: efeito do envelhecimento na composição química e características organolépticas*. Relatório de Estágio Profissionalizante da Licenciatura em Química Tecnológica 2005/2006.

**Berlinet, C., Ducruet, V., Brillouet, J-M., Reynes, M., & Brat P.** (2005) *Evolution of aroma compounds from orange juice stored in polyethylene terephthalate (PET)*. Food Additives and Contaminants. France.

**Bicchi C., Drigo S., & Rubiolo P.** (2000). *Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants*. Journal of Chromatography, volume 892, pp. 469-485. Turin, Italy.

**Bronze M. R., Feliciano R., Antunes C., Vilas Boas L.** (2009). *Accelerated storage of pasteurized orange juice in different packaging: effect on volatile composition and sensory acceptance*. Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry.

**Costa, R.A.S.** (2000). *Estudos de “Shelf-life” em sumos de fruta e seus derivados*. Relatório do trabalho de fim de curso em Eng.<sup>a</sup> Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. Pp 1-13

**Castro, A.G., Pouzada, A.S.** (2002). *Embalagens para a Indústria Alimentar*. Ciência e Técnica. Instituto Piaget. Lisboa. Pp. 17-19, 443-448, 463-465.

**Dixon, J., Hewett, E.** (2000). *Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review*. Journal of Crop and Horticultural Science. Vol. 28: 155-173. The royal society of new zealand. Disponível em: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

---

**Fonseca, R.C.S.** (2003). *Estabilidade Física de néctares e sumos de fruta*. Relatório de trabalho de fim de curso em Eng.<sup>a</sup> Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.1-5

**Gómez-Ariza, J.L., Garcia-Barrera, T., Lorenzo, F.** (2004) *Determination of flavour and off-flavour compounds in orange juice by on-line coupling of a pervaporation unit to gas-chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. Espanha, Huelva. Disponível em: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

**IFJU (international federation of fruit juice producers), Scientific Technical Commission XIX** (1986). *Fruit juices for Europe and Advances in Fruit and Vegetable Juice and Beverage Technology..* Symposium Den Haag. Pp 105, 143, 333, 367.

**Irwin, A., Taub, R., Singh, P.** (1998) *Food storage stability*. By CRC Press LLC.

**Kilcast, D., Subramaniam, P.** (2000) *The stability and shelf-life of food*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology.

**Lodder, R. A** (2005) *Advanced Science and Technology Center*. University of Kentucky. Disponível em: <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/history.html>.

**Lidon, F., e Silvestre, M.M.** (2007). *Indústrias Alimentares Aditivos e Tecnologia*. Escolar Editora. P. 56-57,

**Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., e Gould, G.W.** (2000). *The microbiological safety and quality of food*. Vol. I. Aspen Publishers, Inc. pp 836-841.

**Marcotte, M., Stewart, B., Fustier, P.** (1998). *Abused Thermal Treatment Impact on Degradation Products of Chilled Pasteurized Orange Juice*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Disponível em: <http://pubs.acs.org>.

**Minh Tu, N., Thanh L. X., Une A., Ukeda H. & Sawamura M.** (2002). *Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils*. Flavour and Fragrance Journal. Japan. Pp 169-174.

---

**Mergen, Z.I.** (2003). *Estudo da perda de vácuo em embalagens plásticas multicamadas para produtos cárneos curados cozidos*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina.

**Monteiro, F.T.M.B.** (1999). *Estabilidade Física de Bebidas Concentradas de Laranja*. Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

**Ozkan, M., Aysegul, K., Cemeroglu, B.** (2004). *Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices*. Food Chemistry, v. 88, p. 591-597.

**Pessanha, M.P.B.C.** (2004). *Estudos de “Shelf-life” num Sumo de Laranja*. Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

**Queiroz, S., Collins, C., e Jardim, I** (1999). *Métodos de extracção e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Brasil.

**Rega, B., Fournier N., and Guichard E.** (2003) *Solid Phase Microextraction (SPME) of Orange Juice Flavor: Odor Representativeness by Direct Gas Chromatography Olfactometry (D-GC-O)*. J. Agric. Food Chem. France, vol 51 Pp 7092–7099.

**Sancho, T.P.L.** (1998). *Métodos de despiste rápido de leveduras em concentrados e polpas de fruta: bases para a definição de indicadores microbiológicos*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. P. 1

**Shaw, P., Nagy, S., Chin, C.** (1993) *Fruit Juice Processing Technology*. Auburndale, Florida.

**Willige, R. W. G.** (2002) *Effects of flavour absorption on foods and their packaging materials*, PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands, pp 140.

---

**Yang, X., Peppard, T.** (1994) *Solid-phase Microextraction for flavour analysis*. J. Agric. Food Chem. New Jersey. Pp 1925-1930.

**Zambonin, C., Quinto, M., Vietro N., & Palmisano, F.** (2003). *Solid-phase microextraction – gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices*. Itália. Tirado de: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

### **Sites consultados**

[www.anirsf.pt](http://www.anirsf.pt) (Associação Nacional dos Industriais de Refrigerantes e Sumos de Frutos)

[www.ifst.org](http://www.ifst.org) (institute of food science and technology)

<http://www.cschi.cz/odour/files/world/Thresholds%20table.pdf>

[www.flavornet.org](http://www.flavornet.org)

[www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com)

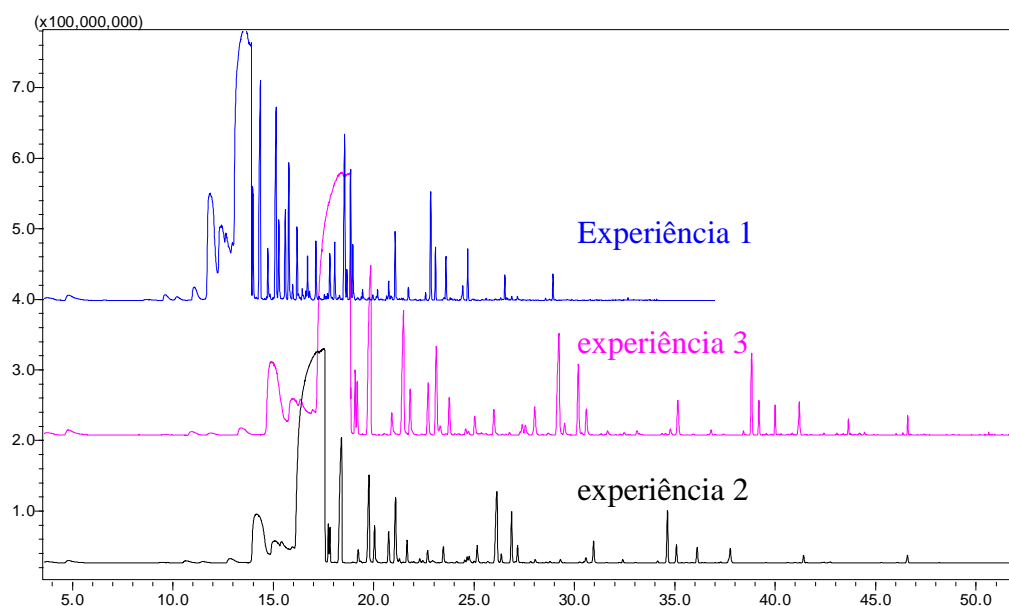
<http://umbbdd.msi.umn.edu/>



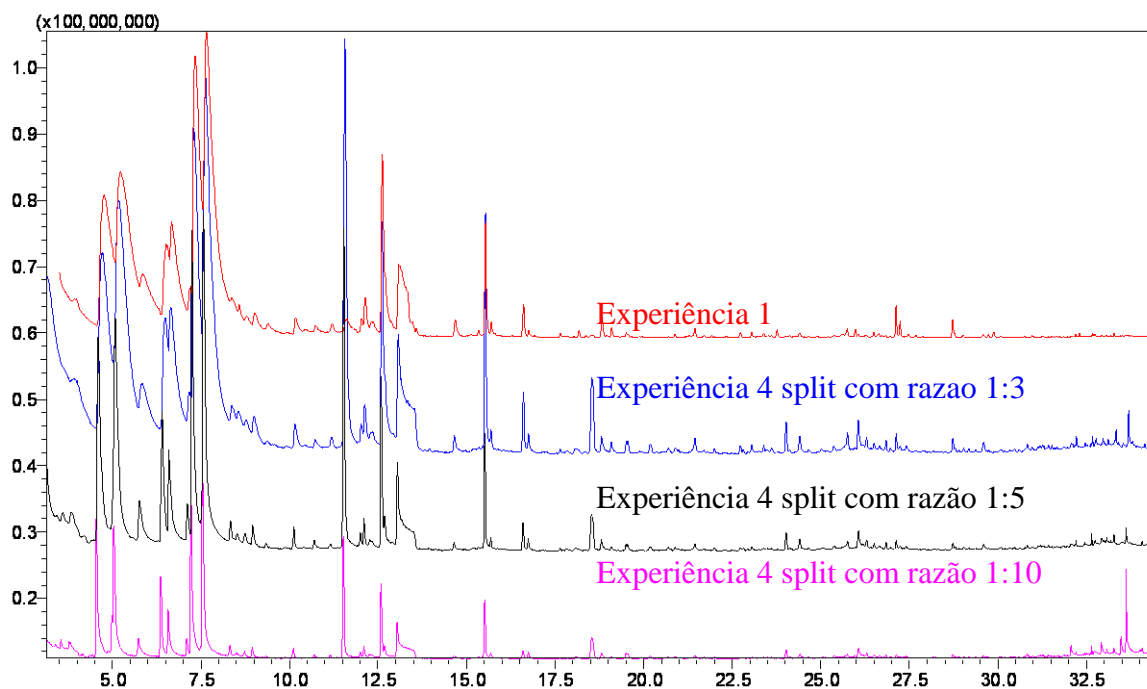
---

## **Apêndices**

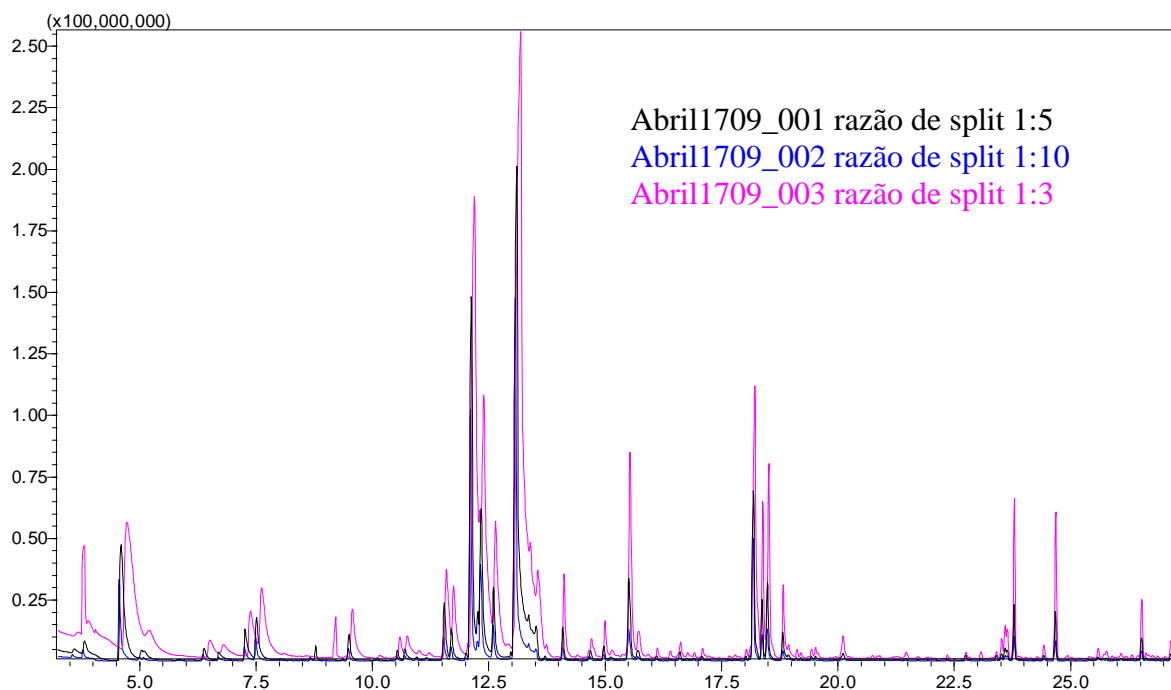
## Apêndice I – Otimização das condições de análise no cromatógrafo



**Figura 35 – Cromatogramas referentes ao refrigerante “B!Limonada” em diferentes condições de análise**



**Figura 36 - Cromatogramas referentes ao sumo de Maçã, com 3 razões de split diferentes e em splitless**



**Figura 37 - Cromatogramas referentes ao refrigerante Bongo, para diferentes razões de split**

## Apêndice II – Optimização das condições da preparação da amostra por MEFS

**Tabela 10 – Extracção por MEFS: tipo de fibra**

	Fibra encarnada			Fibra cinzenta		
	Médias	DP	DPR (%)	Médias	DP	DPR (%)
α-pineno	338191974	10022037.98	3.0	452077073	11051215.71	2.4
octanal	341244900.7	11274097.88	3.3	877004588	8845857.57	1.0
2 β-pineno	81577892.67	5809155.43	7.1	181983402	1271728.064	0.7
Terpinoleno	233463784.7	3308580.447	1.4	325114403.3	4438618.394	1.4
octanol	67267872.33	2511646.613	3.7	157019707.7	2269841.305	1.4
α-terpinoleno	241358805	2675790.798	1.1	350711649.7	4972722.8	1.4
α p-Dimetilestireno	8572526	1222178.097	14.3	54197203.67	800683.9197	1.5
Linalol	523986925.7	6782476.734	1.3	742893105	5130745.268	0.7
1-nonanal	149372487.7	4018938.532	2.7	365731255	2488123.211	0.7
β-terpineol	26975112.33	2344788.116	8.7	42121657.33	1703098.501	4.0
nonanol	18695832.33	1850870.623	9.9	40957116.33	1051163.578	2.6
terpineol-4	83406746.67	6040683.622	7.2	129527260.7	2313436.273	1.8
α-terpineol	230116588.7	14585236.98	6.3	373285631.3	9415191.09	2.5
carvone	33509322	2340506.023	7.0	65516008.67	2458841.693	3.8
geraniol	20265368	2390007.141	11.8	36286035	1339097.47	3.7
valenceno	485127100.3	12160625.95	2.5	526896226.7	3692270.676	0.7

**Tabela 11 – Variação das condições de extracção por MEFS: tempo de exposição**

Tempo de extracção (min)	Áreas totais			Média	DP	DPR (%)
10	7474206363	6987610401	7445970006	7302595590	273150279	3,7
20	7909926934	9474729521	9796850273	9060502243	1009360243	11,1
40	11416532427	11425849302	11399185863	1,1414E+10	13531730,75	0,1
60	11621029183	11539023421	11443029982	1,1534E+10	89091152,66	0,8

### Apêndice III - Ensaios de repetibilidade

**Tabela 12 – Áreas totais dos compostos presentes no Sumo de laranja**

	Áreas totais	Média das Áreas totais	DP	DPR (%)
<b>PET</b>	18916342751	19545627732	363166135	1,9
	19418715654			
	19894383994			
	19493060909			
	19683045798			
	19868217284			
<b>Tetrapak</b>	16734065901	16469009975	196224825.1	1,2
	16512345228			
	16241678272			
	16649948132			
	16366721980			
	16309300338			

**Tabela 13 – Áreas médias de alguns compostos presentes no Sumo de laranja**

Compostos	PET			Tetrapak		
	Area média	DP	DPR (%)	Area média	DP	DPR (%)
$\alpha$ -pineno	203090505,5	10879952,54	5,4	162746181,7	3582926,4	2,2
Octanal	184658221,5	24430784,01	13,2	137874738,7	15620835	11,3
2 $\beta$ -pineno	96318612,33	1990957,734	2,1	85197457,5	1109816,5	1,3
Terpinoleno	211537444,8	4596435,726	2,2	163493377,3	2559219,5	1,6
Octanol	74793040,5	3049455,484	4,1	144106387,8	8658398,2	6,0
$\alpha$ -terpinoleno	271707573,3	7337588,837	2,7	208330430,5	3775042,5	1,8
$\alpha$ p-Dimetilestireno	53043918	5265501,918	9,9	40413646,17	5355616,2	13,3
Linalol	513364409,3	13064643,35	2,5	624996726	4980977,4	0,8
1-nonanal	91199593	1595928,466	1,7	21418816	2765286,4	12,9
$\beta$ -terpineol	21947817,5	1788106,868	8,1	43888310	1787183,5	4,1
Nonanol	46670657,67	1131066,504	2,4	56330985,67	1122739,1	2,0
terpineol-4	286014301,7	9672269,817	3,4	308784530,5	5729618,3	1,9
$\alpha$ -terpineol	449023289,3	9890941,898	2,2	279316228	41322684	14,8
Carvone	19560337,33	1565807,725	8,0	24208924,83	1098211,1	4,5
Geraniol	25960264,67	2884540,398	11,1	89542373,33	4316792,1	4,8

Valenceno	53578922,5	7727381,861	14,4	45716930,67	1758676,1	3,8
-----------	------------	-------------	------	-------------	-----------	-----

**Tabela 14 - Áreas totais dos compostos presentes no refrigerante Bongo**

	Áreas totais	Média das Áreas totais	DP	DPR (%)
<b>PET</b>	5295233786	5303679242	173370777	3,27
	5588667566			
	5381379658			
	5303665895			
	5137068608			
	5116059940			
<b>Tetrapak</b>	3951683252	3976567952	43952048,3	1,11
	3973215399			
	3931039428			
	4045185670			
	4012563052			
	3945720912			

**Apêndice IV – Resultados da evolução dos principais compostos ao longo do tempo presentes no sumo Fresh 100% de Laranja**

**Tabela 15 – Embalagem PET a 40°C**

Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
$\alpha$ -pineno	400204866	32183053,2	8	422410124	7799227	1,8	403718932	16277532	4
octanal	506494819,3	2297480,259	0,5	486249894	30425171	6,3	458881074	21601956	4,7
2 $\beta$ -pineno	144313176,3	2448797,077	1,7	146100331	425930,4	0,3	153700507	421447,2	0,3
Terpinoleno	310335867,7	2503873,564	0,8	311008554	695574,56	0,2	309026408	2471062	0,8
octanol	115858869,7	1516803,136	1,3	114524856	824824,13	0,7	116930383	1800149	1,5
$\alpha$ -terpinoleno	363909635	1054886,545	0,3	367672249	2396894,5	0,7	374545809	998585,7	0,3
$\alpha$ p-Dimetilestireno	64666437	1440007,002	2,2	68755417	377937,96	0,5	90341181	1853810	2,1
Linalol	640158802,7	5511089,323	0,9	631339994	5522858,2	0,9	601005976	3148258	0,5
1-nonanal	269149805,7	1491301,312	0,6	250017588	801821,1	0,3	214457481	2167145	1
B-terpineol	40200091,67	269417,6667	0,7	39800915	693134,6	1,7	45354407	5399125	11,9
nonanol	25540042,67	306667,4516	1,2	27242973	8112175,1	29,8	24479737	438402,8	1,8
terpineol-4	67760079,33	685114,0873	1	66646335	361361,78	0,5	67592437	1245891	1,8
A-terpineol	250376834	2368698,278	0,9	268421533	21514011	8	292076547	4757329	1,6
carvone	47094587	1437387,399	3,1	49102606	416010,82	0,8	49116371	628171,5	1,3
geraniol	20992897,33	5720054,891	27,2	29154095	2418618,9	8,3	35351456	1999433	5,7
valenceno	473398828,3	9578727,912	2	485639567	10035783	2,1	481001406	3042918	0,6

Tempo (dias)	7			10			14		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
$\alpha$ -pineno	349976222,3	30345598,31	8,7	343775273	48247536	14	344479049	8468996	2,5
octanal	480412198,3	5118598,488	1,1	466828845	12636733	2,7	429355262	23444739	5,5
2 $\beta$ -pineno	162952649,3	884588,3516	0,5	166678766	762963,18	0,5	173568534	813472,4	0,5
Terpinoleno	312505293,7	513404,1537	0,2	307813647	969778,66	0,3	310505818	1747340	0,6
octanol	118102647,7	1432410,224	1,2	119977928	1278740,8	1,1	119398818	708061,2	0,6
$\alpha$ -terpinoleno	394907839	2386742,596	0,6	406007924	20458104	5	422874585	1192804	0,3
$\alpha$ p-Dimetilestireno	114675930	1376208,907	1,2	130636885	8953289,1	6,9	144734931	1035679	0,7
Linalol	560276292	2395423,877	0,4	529972604	8538217	1,6	496354852	1870923	0,4
1-nonanal	172846143	2356431,262	1,4	148932996	7921399,6	5,3	125136497	574665,2	0,5
B-terpineol	58221672,67	1480977,452	2,5	67101388	6916655,9	10,3	74440656	1072243	1,4
nonanol	27612190	6773595,525	24,5	25752896	924812,43	3,6	25743627	269332,7	1
terpineol-4	66841162	1140175,671	1,7	67121267	1631377	2,4	65729402	233865,9	0,4
A-terpineol	340733032,7	1422359,97	0,4	374897950	6566051,3	1,8	411180104	1864905	0,5
carvone	49556355	204634,0108	0,4	48812698	1446965,5	3	48499581	264527,9	0,5
geraniol	37585830,33	1507404,077	4	41615609	788924,91	1,9	45535597	4092040	9
valenceno	476543225,3	2823365,858	0,6	477972265	3711142,6	0,8	481832310	4032204	0,8

Tabela 16 - Embalagem Tetrapak a 40 °C

Tempo (dias)	0			1			3		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
$\alpha$ -pineno	268456735	10067245	3,8	246083673	10128780	4,1	248480342	10597928	4,3
octanal	488783898	18151027	3,7	498097998	7850157,8	1,6	457978332	4663847,3	1
2 $\beta$ -pineno	124340084	1809854,6	1,5	123335116	2051496,9	1,7	130541442	1619710,4	1,2
Terpinoleno	246683959	888664,37	0,4	238669017	1529175,4	0,6	242521729	3204781,1	1,3
octanol	133330699	1964966,8	1,5	139833304	2563581,6	1,8	141844234	1769701,6	1,2
A-terpinoleno	274778051	2484509,6	0,9	268197843	2879957	1,1	280996890	3964608,3	1,4
$\alpha$ p-Dimetilestireno	43096181	1159763,1	2,7	45395178	932104,39	2,1	62894919	1197944,2	1,9
Linalol	771268846	64772028	8,4	747216735	3887462,1	0,5	718691881	1789173,4	2,8
1-nonanal	298009005	5001140,8	1,7	304010720	2300671,6	0,8	278266122	4945182,9	0,7
$\beta$ -terpineol	31962706	879176,61	2,8	40582268	3614383,7	8,9	44436917	544313,57	0,2
nonanol	32686521	1119494,7	3,4	33936287	925766,96	2,7	35493721	390853,86	0,9
terpineol-4	82028219	2558831,7	3,1	85904113	1046857,9	1,2	85938801	1058970	3
$\alpha$ -terpineol	260098483	26256754	10,1	287303103	4749728,3	1,7	323485481	2713287,7	3,2
carvone	54976926	2875018,1	5,2	58158315	1842537,8	3,2	60240662	871700,94	0,3
geraniol	28642785	1725653,4	6	28617911	3634525	12,7	35318864	902519,56	1,5
valenceno	451782343	18151743	4	438443322	5261714,5	1,2	441354839	2858665,6	8,1

Tempo (dias)	7			10			14		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
$\alpha$ -pineno	242184973	5425663,2	2,2	228966461	11001846	4,8	226352950	10584074	4,7
octanal	476013962	19130073	4	476435836	26094622	5,5	437786986	31681571	7,2
2 $\beta$ -pineno	140049699	640781,28	0,5	143160945	1450751,9	1	148520782	5080563,6	3,4
Terpinoleno	247019291	1070556,6	0,4	242249211	3429020,3	1,4	242372431	6865683	2,8
octanol	141867381	149373,44	0,1	140926345	2977828,2	2,1	146804064	3722196,7	2,5
A-terpinoleno	299539722	2338588,5	0,8	299386279	1263191,1	0,4	311179464	9398633,5	3
$\alpha$ p-Dimetilestireno	85381858	277492,74	0,3	95244375	1088668,3	1,1	109644856	341963,2	0,3
Linalol	672003095	2143010,7	0,3	634012575	1212100,5	0,2	592274687	11634270	2
1-nonanal	243486588	2423392,6	1	220234906	1987792,4	0,9	191493646	5537236,5	2,9
$\beta$ -terpineol	47671148	623067,64	1,3	52586895	1002707,1	1,9	57154271	2986042,6	5,2
nonanol	30901303	486280,33	1,6	30465977	988101,12	3,2	31218432,5	660106,1	2,1
terpineol-4	86111146	515483,26	0,6	84104451	866860,59	1	81991535	2860729,2	3,5
$\alpha$ -terpineol	364364227	2832860,9	0,8	389130530	5443759,8	1,4	423648099	6495090,4	1,5
carvone	59987958	254759,16	0,4	57749826	808889,85	1,4	58215537	2696049,7	4,6
geraniol	43890103	455994,76	1	46123359	1259592,6	2,7	52131113	4720018,4	9,1
valenceno	434236894	4276822,1	1	436692504	18908384	4,3	437260514	20410827	4,7

**Tabela 17 - Resumo das variações sofridas nos compostos das amostras das embalagens PET e Tetrapak a 40°C**

	PET	Tetrapak
Compostos	aumento(+) ou decréscimo(-) na concentração inicial (%)	
A-pineno	- 14	- 16
octanal	- 15	- 10
2 β-pineno	+ 20	+ 19
terpinoleno	- 1	- 2
octanol	+ 3	+ 10
alfa terpinoleno	+ 16	+ 13
α p-Dimetilestireno	+ 124	+154
Linalol	- 23	- 23
1-nonanal	- 54	- 36
β-terpineol	+ 85	+ 62
nonanol	+ 1	- 5
terpineol-4	- 3	- 1
α-terpineol	+ 64	+ 62
carvone	+ 2	+ 6
geraniol	+ 116	+ 82
valenceno	+ 2	+ 3
total das percentagens	547	504

**Tabela 18 - Embalagem PET à temperatura ambiente**

Tempo (dias)	0			30			60		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
alfa pineno	400204866	32183053,2	8	383071755,3	17704773	4,6	142854600	30990289	21,7
Octanal	506494819	2297480,259	0,5	517731511,7	183120533	35,4	126038474,3	46702447	37,1
2 beta-pineno	144313176	2448797,077	1,7	138808102,3	2444980,9	1,8	77238651,67	6672142	8,6
Terpinoleno	310335868	2503873,564	0,8	302140447	1809653,4	0,6	175930821	14406689	8,2
Octanol	115858870	1516803,136	1,3	112864969,3	1421573,7	1,3	62338063,67	9843741	15,8
alfa-terpinoleno	363909635	1054886,545	0,3	359918121	2765149,1	0,8	227099703	17362802	7,6
α p-Dimetilestireno	64666437	1440007,002	2,2	68589945	6187326,5	9	37441290	1734009	4,6
Linalol	640158803	5511089,323	0,9	652079057,7	9782860,4	1,5	439518521,7	24179333	5,5
1-nonanal	269149806	1491301,312	0,6	229240304,7	4172632	1,8	70119543,33	2952519	4,2
beta terpineol	40200092	269417,6667	0,7	37365819,33	335177,67	0,9	20160377,67	1728518	8,6
Nonanol	25540043	306667,4516	1,2	35510527,67	2167071,4	6,1	14994054,67	1677969	11,2
terpineol-4	67760079	685114,0873	1	65265911	1379370,6	2,1	31061658,33	2357754	7,6
alfa –terpineol	250376834	2368698,278	0,9	292160043,3	6753658,1	2,3	211124243,3	13453714	6,4
Carvone	47094587	1437387,399	3,1	48479860,33	2136315,5	4,4	22978995	1742510	7,6
Geraniol	20992897	5720054,891	27,2	26317937	1905706,7	7,2	12992157,67	848543,3	6,5
Valenceno	473398828	9578727,912	2	527017397,3	19074612	3,6	336405037,3	35371024	10,5



**Tabela 19 - Em embalagem Tetrapak à temperatura ambiente**

Tempo (dias)	0			30			60		
Compostos	Área média	DP	DPR	Área média	DP	DPR	Área média	DP	DPR
alfa pineno	268456735	10067245	3,8	279070764,7	20231900	7,2	143650559	6612761,3	4,6
Octanal	488783898	18151027	3,7	421413766	21603799	5,1	169713438	28041412	16,5
2 beta-pineno	124340084	1809854,6	1,5	119621805,3	3561226,4	3	74970222,67	2201269,3	2,9
Terpinoleno	246683959	888664,37	0,4	239824640	7979536,7	3,3	150833124	3083947,4	2
Octanol	133330699	1964966,8	1,5	124371777	2233787,1	1,8	94497907,67	11578739	12,3
alfa-terpinoleno	274778051	2484509,6	0,9	271326548	8943749,1	3,3	188094338,3	3487360,9	1,9
$\alpha$ p-Dimetilestireno	43096181	1159763,1	2,7	43067088	1807541,2	4,2	28838347	691970,19	2,4
Linalol	771268846	64772028	8,4	735172874,7	15699190	2,1	581831009,7	13644492	2,3
1-nonanal	298009005	5001140,8	1,7	268020727	8656134,6	3,2	108868341,7	12275693	11,3
beta terpineol	31962706	879176,61	2,8	35164480,67	1387920,2	3,9	22437153,67	938328,23	4,2
Nonanol	32686521	1119494,7	3,4	35886095	4756767,6	13,3	28376974,33	4350340,7	15,3
terpineol-4	82028219	2558831,7	3,1	81349778,67	3865102,4	4,8	48240795,67	2043275,9	4,2
alfa -terpineol	260098483	26256754	10,1	305863346,7	15409930	5	257846107,3	9125595,5	3,5
Carvone	54976926	2875018,1	5,2	53832859,67	3084266,7	5,7	31524807,67	1514522,3	4,8
Geraniol	28642785	1725653,4	6	27905399	1790478,2	6,4	17692069	1262774,2	7,1
Valenceno	451782343	18151743	4	469926477,3	25127941	5,3	319153613,7	11739611	3,7

**Tabela 20 - Resumo das variações sofridas nos compostos das amostras das embalagens PET e Tetrapak à temperatura ambiente**

	PET	Tetrapak
Compostos	decrécimo na concentração inicial (%)	
$\alpha$ -pineno	64	46
Octanal	75	65
2 $\beta$ -pineno	46	40
terpinoleno	43	39
Octanol	46	29
alfa terpinoleno	38	32
$\alpha$ p-Dimetilestireno	42	33
Linalol	31	25
1-nonanal	74	63
$\beta$ -terpineol	50	30
nonanol	41	13
terpineol-4	54	41
$\alpha$ -terpineol	16	1
carvone	51	43
geraniol	38	38
valenceno	29	29
total das percentagens	738	567

**Apêndice V – Tratamento Estatístico para o sumo de laranja: Análise de variâncias dos resultados do estudo de envelhecimento (análise de variância Anova/Manova – Teste Fisher LSD, letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes para um nível de confiança de 95%)**

**Tabela 21 - Teste F para os principais compostos presentes nas amostras de sumo de laranja em embalagem PET, à temperatura de 40°C**

	$\alpha$ pineno	octanal	2 $\beta$ - pineno	terpinoleno	octanol	$\alpha$ - terpinoleno	$\alpha$ p- Dimetilestireno	linalol	1- nonanal	$\beta$ terpineol	nonanol	4- terpineol	$\alpha$ - terpineol	carvone	geraniol	valenceno
0	b	C	a	abc	ab	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a
1	b	bc	a	bc	a	b	b	b	b	a	a	ab	b	b	b	b
3	b	ab	b	ab	b	c	c	c	c	b	a	b	c	b	c	ab
7	a	bc	c	c	bc	d	d	d	d	c	a	ab	d	b	cd	ab
10	a	B	d	a	c	e	e	e	e	d	a	ab	e	b	de	ab
14	a	A	e	abc	c	f	f	f	f	e	a	ab	f	ab	e	ab

**Tabela 22 - Teste F para os principais compostos presentes no sumo de laranja em embalagem TP, à temperatura de 40°C**

	$\alpha$ pineno	octanal	2 $\beta$ - pineno	terpinoleno	octanol	$\alpha$ - terpinoleno	$\alpha$ p- Dimetilestireno	linalol	1- nonanal	$\beta$ terpineol	nonanol	4- terpineol	$\alpha$ - terpineol	carvone	geraniol	valenceno
0	c	bc	a	b	a	ab	a	a	a	a	bc	a	a	a	a	a
1	b	c	a	a	b	a	b	a	a	b	c	b	b	ab	a	a
3	b	ab	b	ab	b	b	c	ab	b	c	d	b	c	b	b	a
7	ab	bc	c	b	b	c	d	bc	c	c	a	b	d	b	c	a
10	ab	abc	c	ab	b	c	e	cd	d	d	a	ab	d	ab	c	a
14	a	a	d	ab	c	d	f	d	e	e	ab	a	e	ab	d	a

**Tabela 23 - Teste F para os principais compostos presentes no sumo de laranja em embalagem TP, à temperatura ambiente**

	$\alpha$ pineno	octanal	2 $\beta$ - pineno	terpinoleno	octanol	$\alpha$ - terpinoleno	$\alpha$ p- Dimetilestireno	linalol	1- nonanal	$\beta$ terpineol	nonanol	4- terpineol	$\alpha$ - terpineol	carvone	geraniol	valenceno
0	A	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	A
30	A	b	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	a	a	A
60	B	c	b	b	b	b	b	b	c	c	a	b	a	b	b	B

**Tabela 24 - Teste F para os principais compostos presentes no sumo de laranja em embalagem PET, à temperatura ambiente**

	$\alpha$ pineno	octanal	2 $\beta$ - pineno	terpinoleno	octanol	$\alpha$ - terpinoleno	$\alpha$ p- Dimetilestireno	linalol	1- nonanal	$\beta$ terpineol	nonanol	4- terpineol	$\alpha$ - terpineol	carvone	geraniol	valenceno
0	A	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
30	A	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	b	a	a	b
60	B	b	b	b	b	b	b	b	c	c	c	b	c	b	b	c

**Apêndice VI - Tratamento Estatístico para o refrigerante Bongo: Análise de variâncias dos resultados do estudo de envelhecimento (análise de variância Anova/Manova – Teste Fisher LSD, letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes para um nível de confiança de 95%)**

**Tabela 25 - Teste F para os principais compostos presentes no refrigerante Bongo em embalagem PET, à temperatura de 40°C**

	Butanoato de etilo	Furfural	Acetato de 2 Pentanol	1-Hexanol	$\alpha$ pineno	Mirceno	Hexanoato de etilo	Acetato de hexilo	$\alpha$ terpinoleno	Linalol	Butirato de exilo	$\alpha$ terpineol	Decanal	Valenceno
0	a	-	a	a	a	a	ab	a	a	a	a	a	a	a
1	b	-	b	b	b	a	bc	b	b	a	a	b	a	ab
3	b	-	b	b	c	a	c	c	c	a	a	c	ab	b
7	c	-	bc	c	d	b	bc	bc	c	b	b	d	b	b
12	d	-	d	d	d	bc	bc	bc	c	c	c	de	c	ab
14	d	-	e	d	d	c	a	bc	b	c	d	e	d	a

**Tabela 26 - Teste F para os principais compostos presentes no refrigerante Bongo em embalagem TP, à temperatura de 40°C**

	Butanoato de etilo	Furfural	Acetato de 2 Pentanol	1-Hexanol	$\alpha$ pineno	Mirceno	Hexanoato de etilo	Acetato de hexilo	A terpinoleno	Linalol	Butirato de exilo	$\alpha$ terpineol	Decanal	Valenceno
0	a	-	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab	a	a
1	a	-	a	a	a	b	a	a	b	a	b	b	a	a
3	b	a	b	a	b	b	b	b	cd	b	c	ab	b	a
7	c	a	b	a	c	c	c	c	cd	c	d	ab	c	a
12	cd	b	bc	a	d	c	d	d	d	d	e	ab	d	a
14	d	b	c	a	d	c	e	e	e	d	f	a	d	a

**Tabela 27 - Teste F para os principais compostos presentes no refrigerante Bongo em embalagem PET, à temperatura ambiente**

	Butanoato de etilo	Furfural	Acetato de 2 Pentanol	1-Hexanol	$\alpha$ pineno	Mirceno	Hexanoato de etilo	Acetato de hexilo	$\alpha$ terpinoleno	Linalol	Butirato de exilo	$\alpha$ terpineol	Decanal	Valenceno
0	a		a	a	a	a	a	a	a	a	ab	a	a	A
15	b		ab	b	b	a	b	b	a	b	a	b	b	B
30	c		c	c	b	a	c	c	a	b	b	c	b	C

**Tabela 28 - Teste F para os principais compostos presentes no refrigerante Bongo em embalagem TP, à temperatura ambiente**

	Butanoato de etilo	Furfural	Acetato de 2 Pentanol	1-Hexanol	$\alpha$ pineno	Mirceno	Hexanoato de etilo	Acetato de hexilo	$\alpha$ terpinoleno	Linalol	Butirato de exilo	$\alpha$ terpineol	Decanal	Valenceno
0	a		A	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
15	b		A	a	b	b	b	a	b	b	a	b	b	b
30	c		B	b	c	c	b	b	c	c	b	c	a	c

**Apêndice VII – Efeito das temperaturas de congelação na estabilidade das amostras de sumo de laranja**

**Tabela 29 - Resultados das Áreas médias totais obtidas para cada tempo de envelhecimento e cada tempo de congelação**

		Tempo de envelhecimento antes da congelação (dias)					
		0	1	3	7	12	14
não congelado	Área média total	9173145324	9451233383	9292617883	9211965767	8967296947	8922203964
	DP	261712325	43037440	55876295	26944972	106927017	29430981
	DPR (%)	2,9	0,5	0,6	0,3	1,2	0,3
congelado 1 dias	Área média total	9063286904	9192766155	9007984543	9135628926	8750816471	8572066185
	DP	221829473	180134927	323895072	59699203	184322566	363219402
	DPR (%)	2,4	2,0	3,6	0,7	2,1	4,2
congelado 5 dias	Área média total	7676265262	8003462579	8595043973	8956100067	7984623189	7967973068
	DP	162871869	29617852	79882080	181704096	61578033	321210458
	DPR (%)	2,1	0,4	0,9	2,0	0,8	4,0
congelado 11 dias	Área média total	8240916243	7852303753	7451041226	7842949495	7653616882	7428028\$99
	DP	256158754	98!15105	20376616!	80316667	329943136	305162376
	DPR (%)	3,1	1,2	2,6	1,0	4,2	3,9

---

**Apêndice VIII – Teor de ácido ascórbico presente nas amostras de sumo de laranja à temperatura de 40°C**

**Tabela 30 - Média das áreas obtidas para as amostras de sumo de laranja embaladas em Tetrapak e PET para cada tempo de envelhecimento estudado**

Tempo	PET			Tetrapak		
	Média	DP	DPR (%)	Média	DP	DPR (%)
0	3737827	5505	0,1	4016767	294486	7,3
1	3820260	37865	1	4218373	401198	9,5
3	3540710	27652	0,8	4722199	105448	2,2
7	3638524	19936	0,5	4427387	107585	2,4
10	3638524	28096	0,8	4384263	72044	1,6
14	3366308	13866	0,4	4300819	53118	1,2

**Apêndice IX – Resultados da evolução dos principais compostos ao longo do tempo presentes no refrigerante Bongo**

**Tabela 31 - Em embalagem Tetrapak à temperatura de 40°C**

Tempo (dias)	0			1			3		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
Butanoato de etilo	180234804	1799597,4	1,0	181107382	3284836	1,8	164652563	1057785,5	0,6
<b>Furfural</b>	-	-	-	-	-	-	7371576,3	704037,68	9,6
Acetato de 2 Pentanol	11306604	185646,64	1,6	11734874	544160,68	4,6	10038712	633761,85	6,3
1-Hexanol	32771093	85313,14	0,3	34772332	651806,24	1,9	33015951	496006,54	1,5
$\alpha$ pineno	7095111,5	140545,25	2,0	6641872	143556,15	2,2	5096026	245764,09	4,8
Mirceno	45757011	830597,32	1,8	40340046	110188,22	0,3	39728960	1599413,9	4,0
Hexanoato de etilo	48014468	2698828,6	5,6	46692600	1052054,8	2,3	41870442	1782704,4	4,3
Acetato de hexilo	50868095	745124,38	1,5	50047221	1332028	2,7	43144793	549944,9	1,3
$\alpha$ terpinoleno	9344944	229330,29	2,5	8538672	264756,1	3,1	8286971,7	84760,858	1,0
Linalol	73581601	3624023,1	4,9	73192504	6197235,6	8,5	55808131	8055697	14,4
Butirato de exilo	30447919	36696,014	0,1	28547562	740109,24	2,6	24886264	248425,8	1,0
<b><math>\alpha</math> terpineol</b>	59536404	593069,55	1,0	65122896	4349927,5	6,7	60093017	703562,2	1,2
Decanal	33161986	279538,4	0,8	33088931	772815,97	2,3	29139026	1351196,5	4,6
Valenceno	5899532,5	464783,41	7,9	4855137,7	206812,77	4,3	4016400,3	134661,65	3,4

Tempo (dias)	7			12			14		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
Butanoato de etilo	151461593	11587667	7,7	141759055	3746075,3	2,6	130954150	9643127,3	7,4
<b>Furfural</b>	11768312	4118966,7	35,0	20080429	7679245,5	38,2	26886965	57761,432	0,2
Acetato de 2 Pentanol	9551910	940069,17	9,8	9202198,7	765742,1	8,3	8065342,3	818521,11	10,1
1-Hexanol	32970484	2604702	7,9	34238659	1867498,4	5,5	32591339	4650403,6	14,3
$\alpha$ pineno	4499016	488050,79	10,8	3551902,3	172226,69	4,8	3289651,7	380455,71	11,6
Mirceno	34975185	2184012,4	6,2	33186789	869216,66	2,6	32992099	1073610,8	3,3
Hexanoato de etilo	34512172	1437032,6	4,2	24715816	1030196,4	4,2	21152729	2341940,7	11,1
Acetato de hexilo	39962098	2467779,2	6,2	35684245	1608871,8	4,5	31925319	860459,29	2,7
$\alpha$ terpinoleno	7993510,7	260874,31	3,3	8168235,3	102139,03	1,3	7574150,3	280517,59	3,7
Linalol	45641136	3262700,3	7,1	27831371	3612073,1	13,0	19427862	1001360,8	5,2
Butirato de exilo	22575302	624747,44	2,8	19405835	1064471,6	5,5	16899336	440934	2,6
<b><math>\alpha</math> terpineol</b>	58353905	4773036,7	8,2	57563518	5377697,1	9,3	52945304	6081984,8	11,5
Decanal	26339556	1375211,2	5,2	21993343	710604,8	3,2	23274136	1512556,6	6,5
Valenceno	3513585	66436,169	1,9	3425063,7	24617,502	0,7	3609341,7	543398,75	15,1



**Tabela 32 - Em embalagem PET à temperatura de 40°C**

Tempo (dias)	0			1			3		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
Butanoato de etilo	48593526,7	6802576,4	14,0	59776745,33	1267876,8	2,1	63244299,7	3010255,4	4,8
<b>Furfural</b>	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0
Acetato de 2 Pentanol	2619526,67	599908,75	22,9	3756874	179603,89	4,8	3939226,67	434282,63	11,0
1-Hexanol	12757050,7	2682535,2	21,0	16590227,33	357818,73	2,2	18726540,7	1236522	6,6
$\alpha$ pineno	30458100	3577072,2	11,7	19125564	962108,62	5,0	7544217	342954,86	4,5
Mirceno	264912536	24723619	9,3	267479990	12582538	4,7	270106518	14592562	5,4
Hexanoato de etilo	335923850	12394906	3,7	367129778,7	10114238	2,8	389449576	5682721,9	1,5
Acetato de hexilo	54416736,3	3345972,5	6,1	63240281	2268741,2	3,6	70449886	3288631	4,7
$\alpha$ terpinoleno	51896629,7	5376673,7	10,4	64764366,33	4204954,1	6,5	76347661,3	7029816,4	9,2
Linalol	67769459,3	10351805	15,3	69312706,67	5084259,1	7,3	66448522,3	4516014,3	6,8
Butirato de exilo	76037630,7	3967820,3	5,2	78886023,33	3862208	4,9	77814192,7	4914699,3	6,3
<b><math>\alpha</math> terpineol</b>	68064025,7	2789933	4,1	90583027	6876338,2	7,6	114954662	6124125,8	5,3
Decanal	44986548,3	2801573,4	6,2	44633383	557376,81	1,2	39340659,3	6204858,5	15,8
Valenceno	31896660,3	3972598,1	12,5	35592551	2783156,7	7,8	39447362,7	1784237,2	4,5

Tempo (dias)	7			12			14		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
Butanoato de etilo	70965535	1169656,4	1,6	78651374,33	3410299,1	4,3	80801710,3	3289922,5	4,1
<b>Furfural</b>									
Acetato de 2 Pentanol	3786805,5	4326,7864	0,1	4409379,667	121855,89	2,8	5257976,33	314263,21	6,0
1-Hexanol	22447542,5	902263,3	4,0	26167994,33	282793,15	1,1	28597988,3	1535257,2	5,4
$\alpha$ pineno	3707954	246672,79	6,7	2546060,667	65289,161	2,6	2345349	237018,15	10,1
Mirceno	229974879	5758947,7	2,5	207747888,7	4724087,9	2,3	184269664	9147200,3	5,0
Hexanoato de etilo	367236189	5838716,5	1,6	361937884,7	153793,89	0,0	305043601	50105536	16,4
Acetato de hexilo	68011932	450620,77	0,7	65863880	553313,47	0,8	64883622,7	6006776,2	9,3
$\alpha$ terpinoleno	73640920,5	2155226,8	2,9	73356566,67	2055909,9	2,8	63411787,3	4310083,2	6,8
Linalol	52796485	871315,36	1,7	37657627,33	1324327,1	3,5	33267461	2967288,5	8,9
Butirato de exilo	64992856	316660,8	0,5	52864531	724776,27	1,4	37363576,3	11975454	32,1
<b><math>\alpha</math> terpineol</b>	126108121	2997747,4	2,4	137530376,7	7524784,1	5,5	134165197	6403816,7	4,8
Decanal	33598748,5	1452951	4,3	24670979,67	3668215	14,9	13626480	8737787,7	64,1
Valenceno	39078843,5	2763446,1	7,1	35344148,67	1460089,3	4,1	33665118	738351,35	2,2

**Tabela 33 - Resumo das variações sofridas nos compostos das amostras das embalagens PET e Tetrapak à temperatura de 40°C**

	PET	Tetrapak
Compostos	aumento(+) ou decréscimo(-) na concentração inicial (%)	
Butanoato de etilo	+ 66	- 28
Acetato de 2 Pentanol	+ 100	- 29
1-Hexanol	+ 124	- 1
$\alpha$ pineno	- 92	- 54
Mirceno	- 41	- 28
Hexanoato de etilo	- 9	- 56
Acetato de hexilo	+ 19	- 38
$\alpha$ terpinoleno	+ 22	- 19
Linalol	- 51	- 74
Butirato de exilo	- 51	- 44
$\alpha$ terpineol	+ 97	- 12
Decanal	- 70	- 30
Valenceno	+ 5	- 39
total das percentagens	747	452

**Tabela 34 - Em embalagem PET à temperatura ambiente**

Tempo (dias)	0			15			30		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
Butanoato de etilo	48593526,7	6802576	14,0	70934417	4174084	5,9	104049477	2485749	2,4
Furfural	0	0	0,0	0	0	0	3910664	475942	12,2
Acetato de 2 Pentanol	2619527	599909	22,9	4414097	166372376	3,8	6262372	200820	3,2
1-Hexanol	12757050,7	2682535	21,0	22838006	384779	1,7	29599996	307352	1,0
$\alpha$ pineno	30458100	3577072	11,7	14526160	592963	4,1	9746505	182040	1,9
Mirceno	264912536	24723619	9,3	261380729	3088546	1,2	246286077	2976750	1,2
Hexanoato de etilo	335923850	12394906	3,7	163297402	1733240	1,1	62155645	134152	0,2
Acetato de hexilo	54416736,3	3345973	6,1	69360879	2388321	3,4	89011622	900385	1,0
$\alpha$ terpinoleno	51896629,7	5376674	10,4	49908917	415017	0,8	52920598	356923	0,7
Linalol	67769459,3	10351805	15,3	88579287	1133810	1,3	88938992	1342422	1,5
Butirato de exilo	76037630,7	3967820	5,2	69537209	2977885	4,3	80630983	1595486	2,0
$\alpha$ terpineol	68064025,7	2789933	4,1	102685852	2306966	2,2	118045090	1661536	1,4
Decanal	44986548,3	2801573	6,2	36239641	98178	0,3	34135616	83461	0,2
Valenceno	31896660,3	3972598	12,5	49564810	141385	0,3	39880931	497677	1,2

**Tabela 35 - Em embalagem Tetrapak à temperatura ambiente**

Tempo (dias)	0			15			30		
Compostos	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)
Butanoato de etilo	180234804	1799597	1	163172082	3321311	2,0	199059158	1400303	0,7
<b>Furfural</b>	0	0	0	5328687	166920	3,1	15677264	522403	3,3
Acetato de 2 Pentanol	11306604	185647	1,6	11381701	97756	0,9	14711797	360150	2,4
1-Hexanol	32771093	85313	0,3	35200713	158560	0,5	44073533	645098	1,5
$\alpha$ pineno	7095111,5	140545	2	6146980	69562	1,1	5823969	59683	1,0
Mirceno	45757011	830597	1,8	51463338	201987	0,4	57914582	731142	1,3
Hexanoato de etilo	48014468	2698829	5,6	56529915	795257	1,4	54349098	718180	1,3
Acetato de hexilo	50868095	745124	1,5	50969746	694444	1,4	61992602	1311669	2,1
A terpinoleno	9344944	229330	2,5	10997676	168064	1,5	12941421	108496	0,8
Linalol	73581601	3624023	4,9	59669265	852889	1,4	69165640	596617	0,9
Butirato de exilo	30447919	36696	0,1	29680828	688366	2,3	35354971	996849	2,8
<b><math>\alpha</math> terpineol</b>	59536404	593070	1	67298927	2608324	3,9	84936814	388148	0,5
Decanal	33161986	279538	0,8	67060016	420411	0,6	33157349	854019	2,6
Valenceno	5899532,5	464783	7,9	8657937	1050753	12,1	6658455	230717	3,5

**Tabela 36 - Resumo das variações sofridas nos compostos das amostras das embalagens PET e Tetrapak à temperatura ambiente**

	PET	Tetrapak
Compostos	aumento(+) ou decréscimo(-) na concentração inicial (%)	
Butanoato de etilo	+114	+10
Acetato de 2 Pentanol	+139	+30
1-Hexanol	+132	+34
$\alpha$ pineno	-68	-18
Mirceno	-7	+26
Hexanoato de etilo	-81	+13
Acetato de hexilo	+64	+21
$\alpha$ terpinoleno	+1	+38
Linalol	+31	-6
Butirato de exilo	+6	+16
<b><math>\alpha</math> terpineol</b>	+73	+43
Decanal	-25	0
Valenceno	+25	+13
total das percentagens	766	268

**Apêndice X – Efeito das temperaturas de congelação na estabilidade das amostras do refrigerante Bongo**

**Tabela 37 - Resultados das Áreas médias totais obtidas para cada tempo de envelhecimento e cada tempo de congelação**

		Tempo de envelhecimento antes da congelação (dias)					
		0	1	3	7	12	14
não congelado	Área média total	4621461690,0	4860774812,3	4881711803,3	4509776588,5	4164164967,0	3768724159,0
	DP	208995410,0	79250778,0	96881247,1	17252929,6	49028434,2	182160826,0
	DPR (%)	4,5	1,6	2,0	0,4	1,2	4,8
congelado 4 dias	Área média total	3998026599,5	4274053451,0	3787849681,0	3979508519,0	2820625878,5	2928541371,0
	DP	26242955,1	286697926,5	196291721,0	134350288,4	176251881,4	118496049,3
	DPR (%)	0,7	6,7	5,2	3,5	6,2	4,0
congelado 14 dias	Área média total	2696880148,0	3150068102,0	3161202281,5	2969962040,5	2526849851,0	2538369975,5
	DP	97073672,4	58698235,7	125928818,1	17984065,6	6690010,1	89881575,1
	DPR (%)	3,6	1,9	4,0	0,6	0,3	3,5

---

**Apêndice XI – Teor de ácido ascórbico presente nas amostras do refrigerante Bongo à temperatura de 40°C**

**Tabela 38 - Média das áreas obtidas para as amostras do refrigerante Bongo embaladas em Tetrapak e PET para cada tempo de envelhecimento estudado**

Tempo	PET			Tetrapak		
	Média	DP	DPR (%)	Média	DP	DPR (%)
0	1707661	233467	13,7	5304178	94795	1,8
1	1559616	125251	8,0	6249146	863988	13,8
3	1751089	292535	16,7	4191413	68990	1,6
7	1332092	170948	12,8	4143788	170307	4,1
12	1199960	152744	12,7	3950195	113417	2,9
14	1338681	166995	12,5	3865647	55917	1,4

---